

**DOLICHOS BIFLORUS LEKTIN - AFFINITÄT
UND SIALISIERUNGSGRAD ALS KENNZEICHEN
FÜR ORGANDIFFERENZIERUNGSVORGÄNGE
WÄHREND DER NORMALENTWICKLUNG
EINE HISTOCHEMISCHE STUDIE
AN DER NMRI - MAUS**

BÄRBEL SCHÖNLEBER

~~1987~~

Disbui. München

1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Pathologie der Gesellschaft für
Strahlen- und Umweltforschung mbH München
Arbeitsgruppe "Embryologie und Teratologie"
Leiter: Dr. med. vet. habil. W. Schmahl

Vorgelegt über den
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. E. Dahme

**Dolichos biflorus Lektin-Affinität und Sialisierungsgrad
als Kennzeichen für Organdifferenzierungsvorgänge
während der Normalentwicklung
Eine histochemische Studie an der NMRI-Maus**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Bärbel Schönleber
aus
Monzingen

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Prof. Dr. E. Dahme

Korreferent: Prof. Dr. H.G. Liebich

Tag der Promotion: 26. Februar 1988

1.1	Wohnung	1
1.2	Wohnung	1
1.3	Wohnung	1
1.4	Wohnung	1
1.5	Wohnung	1
1.6	Wohnung	1
1.7	Wohnung	1
1.8	Wohnung	1
1.9	Wohnung	1
1.10	Wohnung	1
1.11	Wohnung	1
1.12	Wohnung	1
1.13	Wohnung	1
1.14	Wohnung	1
1.15	Wohnung	1
1.16	Wohnung	1
1.17	Wohnung	1
1.18	Wohnung	1
1.19	Wohnung	1
1.20	Wohnung	1
1.21	Wohnung	1
1.22	Wohnung	1
1.23	Wohnung	1
1.24	Wohnung	1
1.25	Wohnung	1
1.26	Wohnung	1
1.27	Wohnung	1
1.28	Wohnung	1
1.29	Wohnung	1
1.30	Wohnung	1
1.31	Wohnung	1
1.32	Wohnung	1
1.33	Wohnung	1
1.34	Wohnung	1
1.35	Wohnung	1
1.36	Wohnung	1
1.37	Wohnung	1
1.38	Wohnung	1
1.39	Wohnung	1
1.40	Wohnung	1
1.41	Wohnung	1
1.42	Wohnung	1
1.43	Wohnung	1
1.44	Wohnung	1
1.45	Wohnung	1
1.46	Wohnung	1
1.47	Wohnung	1
1.48	Wohnung	1
1.49	Wohnung	1
1.50	Wohnung	1
1.51	Wohnung	1
1.52	Wohnung	1
1.53	Wohnung	1
1.54	Wohnung	1
1.55	Wohnung	1
1.56	Wohnung	1
1.57	Wohnung	1
1.58	Wohnung	1
1.59	Wohnung	1
1.60	Wohnung	1
1.61	Wohnung	1
1.62	Wohnung	1
1.63	Wohnung	1
1.64	Wohnung	1
1.65	Wohnung	1
1.66	Wohnung	1
1.67	Wohnung	1
1.68	Wohnung	1
1.69	Wohnung	1
1.70	Wohnung	1
1.71	Wohnung	1
1.72	Wohnung	1
1.73	Wohnung	1
1.74	Wohnung	1
1.75	Wohnung	1
1.76	Wohnung	1
1.77	Wohnung	1
1.78	Wohnung	1
1.79	Wohnung	1
1.80	Wohnung	1
1.81	Wohnung	1
1.82	Wohnung	1
1.83	Wohnung	1
1.84	Wohnung	1
1.85	Wohnung	1
1.86	Wohnung	1
1.87	Wohnung	1
1.88	Wohnung	1
1.89	Wohnung	1
1.90	Wohnung	1
1.91	Wohnung	1
1.92	Wohnung	1
1.93	Wohnung	1
1.94	Wohnung	1
1.95	Wohnung	1
1.96	Wohnung	1
1.97	Wohnung	1
1.98	Wohnung	1
1.99	Wohnung	1
2.00	Wohnung	1

Für meine lieben Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Problemstellung	1
2. Einleitung	3
2.1 Lektine	3
2.1.1 Allgemeines	3
2.1.1.1 Geschichte	3
2.1.1.2 Definition	4
2.1.1.3 Aufbau	5
2.1.1.4 Spezifizierung, Klassifizierung und Nomenklatur	5
2.1.1.5 Biologische Funktion	7
2.1.1.6 Eigenschaften der Lektine bei der Interaktion mit Zellen	8
2.1.1.7 Verwendung von Lektinen	10
2.1.1.8 Methoden zu Lektinbindungsstudien	10
2.1.2 Dolichos biflorus-Agglutinin	11
2.2 Sialinsäure	12
2.2.1 Definition	12
2.2.2 Vorkommen	12
2.2.3 Biologische Funktion	14
2.2.4 Neuraminidase	16
3. Material und Methode	16
3.1 Versuchstiere	17
3.2 Präparation und Herstellung der histologischen Schnitte	17
3.3 Lektinfärbung	18
3.4 Kontrollfärbung	18
3.5 Gegenfärbung	19
3.6 Neuraminidase-Vorbehandlung	20
3.7 Vorbehandlung mit anderen Enzymen	21
4. Ergebnisse	22
4.1 Haut	22
4.2 Muskulatur	23
4.3 Knochen	23
4.4 Herz und Aorta	24
4.5 Nasenhöhlen	24
4.6 Trachea	25
4.7 Lunge	25
4.8 Zähne	26
4.9 Speicheldrüsen	27
4.9.1 Submandibulardrüse	27
4.9.2 Sublingualdrüse	27
4.9.3 Parotis	28
4.10 Magen	28
4.11 Darm	29
4.12 Pankreas	29
4.13 Leber	29
4.14 Lymphknoten	30
4.15 Thymus	30

4.16	Milz	31
4.17	Nieren	31
4.18	Harnblase	32
4.19	Hoden, Nebenhoden	32
4.20	Ovarien, Eileiter	33
4.21	Rückenmark	33
4.22	Gehirn	34
4.23	Meningen	35
4.24	Ganglien	35
4.25	Augen	35
4.26	Ohren	36
4.27	Hypophyse	37
4.28	Schilddrüse	37
4.29	Nebennieren	38
4.30	Kontrollreaktionen zur DBA-HRP-Histochemie	38
4.31	Neuraminidase-Testversuch	38
4.32	Vorbehandlung mit anderen Enzymen	39
4.33	Tabellen	40
4.34	Abbildungen	46
5.	Diskussion	56
5.1	Aussagekraft der Lektin-Bindungsreaktion	56
5.2	Lokalisation und Funktion der DBA-Rezeptoren	58
5.3	Freilegung der DBA-Rezeptoren durch Enzymbehandlung	69
5.4	Geschlechtsdimorphismus an der Niere	76
5.5	Spezifität der NMRI-Maus	77
6.	Zusammenfassung / Abstract	80
7.	Abkürzungen	84
8.	Literaturverzeichnis	85
	Danksagung	97
	Lebenslauf	98

1. PROBLEMSTELLUNG

Vor etwa drei Jahren gelang am Institut erstmals die Beschreibung einer ausgeprägten Expression von Glycokonjugaten mit terminalem GalNAc und deren Lektin-histochemische Darstellung an den Endothelien der Blutgefäße der NMRI-Maus. Diese ersten Untersuchungen waren noch auf das Zentralnervensystem und seine Hüllen während der Organbildungsperiode der Maus begrenzt (57). Aufgrund der dort gewonnenen Erkenntnis einer sehr differenzierten, phasenspezifischen Expression dieses Endothelmarkers wurden ausgedehnte Versuche zur Verwendbarkeit der Dolichos biflorus-Lektin-Affinität bei der Charakterisierung embryotoxischer Schädigungsmuster durchgeführt. Diese, z.T. noch unveröffentlichten Ergebnisse zeigten eine sehr gute Anwendbarkeit dieser Methode in teratologischen Experimenten mit ionisierenden Strahlen, selbst bei sehr kleinen Dosen. Dabei stellten sich überraschend die normalerweise DBA-negativen Neuroblasten als besonders sensible Indikatoren eines Strahlenschadens dar.

Angeregt und ermutigt durch solche Befunde, war das Interesse der Arbeitsgruppe Teratologie auf die Ausdehnung der an dem Zentralnervensystem erhobenen Befunde auf toxische Schäden auch anderer Gewebe und Organsysteme gerichtet.

Die vorliegende Arbeit soll somit durch die Erstellung des physiologischen Verteilungsmusters der DBA-Rezeptoren die Grundlage für weiterführende Versuche darstellen. Dabei wurde

nicht nur auf das gefäßspezifische DBA-Bindungsmuster Wert gelegt, sondern insbesondere auch auf die Entwicklung solcher Rezeptoren in Parenchym und Interstitialgewebe von der Fetalperiode bis zum adulten Tier. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Untersuchungen ist die histochemische Charakterisierung des Sialisierungsgrades von Zellen bei solchen Entwicklungsprozessen. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, nicht nur Aussagen über morphogenetische Phänomene zu ermöglichen, sondern durch Einbeziehung der histochemischen Erkenntnisse über den Sialisierungsgrad der Zellen auch ansatzweise ein Bindeglied zwischen embryologisch-teratologischen Prinzipien und den zellbiologischen Grundlagen bei der diaplazentaren Karzinogenese herzustellen.

2. EINLEITUNG

2.1 Lektine

2.1.1 Allgemeines

2.1.1.1 Geschichte

Die Lektinforschung nahm ihren Anfang 1888, als Stillmark aus dem Stamm des Wunderbaumes, *Ricinus communis*, einen Stoff isolierte, der zur Agglutination von Erythrozyten verschiedener Tiere führte.

1891 fand Hellin ein anderes Lektin, Abrin aus den Bohnen von *Abrus precatorius*. Diese beiden Stoffe, wegen ihrer Herkunft und ihrer Eigenschaften auch Hämagglutinine oder Phytohämagglutinine genannt, dienten Paul Ehrlich 1891 zu seinen klassischen Studien, die zu der Entdeckung der Antikörper führten.

In den folgenden Jahren wurden zahlreiche neue Lektine isoliert, zunächst aus Pflanzen, später auch aus Invertebraten und Vertebraten.

1908 entdeckte Landsteiner, daß die Hämagglutinationsreaktion der Lektine speziesspezifisch ist, als er beobachtete, daß das Lektin der Linsen zwar Kaninchen-Erythrozyten, nicht aber Tauben-Erythrozyten agglutininieren kann.

Als Sumner und Howell 1936 feststellten, daß die Agglutination von Erythrozyten durch Concanavalin A nach Zugabe von Rohrzucker inhibiert werden kann, führte dies zu der Annahme, daß die Hämagglutinationsreaktion die Konsequenz einer Reaktion dieses Proteins mit bestimmten Kohlenhydraten der Erythrozyten-Oberfläche ist.



1945 bis 1949 entdeckten Renkonen sowie Boyd und Reguera, daß Lektine nicht nur speziesspezifisch, sondern auch blutgruppenspezifisch Erythrozyten agglutinieren. Solche blutgruppenspezifischen Lektine sind *Lobus tetragonolobus* für Blutgruppe 0 und *Phaseolus limensis* für Blutgruppe A beim Menschen. Aufgrund dieser spezifischen Eigenschaften gab Boyd der Stoffgruppe den Namen "Lektine" von lat. *legere* = auswählen (68, 80).

2.1.1.2 Definition

Nach heutigen Erkenntnissen versteht man unter Lektinen Proteine oder Glycoproteine, die in der Lage sind, bestimmte Abschnitte von komplexen Kohlenhydraten spezifisch zu erkennen und sich an diese Anteile reversibel zu binden, ohne die kovalenten Strukturen dieser Glycosyl-Liganden zu verändern. Sie besitzen keine verwandtschaftliche Beziehung zu Antikörpern.

Lektine können spezifisch Zellen agglutinieren oder Glykokonjugate präzipitieren. Sie können prinzipiell bei allen Pflanzen und Tieren auftreten, löslich oder membrangebunden sein und können unterschiedliche biologische Aktivitäten besitzen, z.B. als Toxine, Hormone oder Enzyme.

Durch ihrer Spezifität entsprechende Zucker niedrigen Molekulargewichts, sogenannte Haptene, kann ihre Interaktion mit löslichen oder zellgebundenen glycosylierten Makromolekülen verhindert werden.

Nicht zu den Lektinen zählt man kohlenhydratspezifische Immunglobuline und Enzyme sowie kohlenhydratbindende Proteine, die sich nur an freie Zucker, nicht aber an komplexe Kohlenhydrate binden (34, 85).

2.1.1.3 Aufbau

Lektine bilden eine sehr inhomogene Stoffgruppe. Sie scheinen außer ihrer Eigenschaft, Proteine zu sein, keine gemeinsamen Strukturen zu haben.

Sie variieren im Molekulargewicht sehr stark (z.B. 36000 bei *Tritium vulgare* (WGA) und 335000 bei *Limulus polyphemus*) (135), in der Zahl der Untereinheiten und in ihrer Aminosäurezusammensetzung. So ist beispielsweise WGA sehr reich an Cystin (20%), während viele Lektine keinerlei Cystin enthalten.

Viele Lektine sind Glycoproteine mit einem Zuckergehalt bis zu 51 % (130). Bei einer Anzahl von Lektinen existieren Isolektine. Dies sind Stoffe mit sehr ähnlichen chemischen und biologischen Eigenschaften, die eine gleiche Kohlenhydratspezifität besitzen, sich aber elektrophoretisch unterschiedlich verhalten (39, 57).

2.1.1.4 Spezifität, Klassifizierung und Nomenklatur

Die meisten Lektine binden sich an eine einzige

Zuckerstruktur. Für manche Lektine ist diese Spezifität jedoch weitergefaßt, so daß sie eine Anzahl nahe verwandter Zucker wie Mannopyranose / Glucopyranose binden. Andererseits treten verschiedene Lektine nur mit komplexen Kohlenhydratstrukturen in Interaktion, wie solche Strukturen, die in Glycoproteinen oder auf Zelloberflächen auftreten. Dabei können Lektine mit gleicher Spezifität gegenüber Monosacchariden doch erheblich in ihrer Affinität für bestimmte Di-, Oligosaccharide oder Glycopeptide differieren. Entscheidende Rolle spielt hier die gesamte Tertiärstruktur (39).

Allgemein gilt, daß die Bindung zwischen dem Lektin und dem Zucker schwach, nicht kovalent und darum reversibel ist. Dabei hat das Lektin zwei und mehr Bindungsregionen zur Interaktion mit den in der Regel terminalen Glycosylgruppen des Kohlenhydrats (80).

Entsprechend der verbindenden und wichtigsten Eigenschaft der Kohlenhydratbindung werden die Lektine nach ihrer Zuckerspezifität klassifiziert. Hierbei können sieben große Gruppen unterschieden werden (57):

Spezifität für	Beispiel
1. D-Mannose oder D-Glucose	Con A
2. N-Acetyl-D-Glucosamin	WGA
3. N-Acetyl-Galactosamin	DBA
4. D-Galactose	PNA, RCA
5. L-Fucose	UEA
6. Sialinsäure	LPA
7. komplexe Kohlenhydrate	PHA

Bei der Nomenklatur der Lektine wird ihre Herkunft, das heißt ihre biologische Quelle, berücksichtigt, wobei i.d.R. der lateinische Name gebraucht, die allgemein gebräuchliche Abkürzung aber häufig aus dem Englischen übernommen wird (57).

Tabelle 1 zur Herkunft, Nomenklatur und Spezifität einiger Lektine (57):

Benennung und Herkunft	Spezifität
<i>Arachis hypogaea</i> (PNA) Erdnuß	D-Gal- β -(1-3)-GalNAc
<i>Concanavalia ensiformis</i> (Con A) Schwertbohne	α -D-Glc, α -D-Man
<i>Dolichos biflorus</i> (DBA) Dicke Bohne	α -D-GalNAc
<i>Ricinus communis</i> (RCA) Rizinussamen	β -D-GalNAc, D-GalNAc
<i>Tritium vulgare</i> (WGA) Weizenkeim	β -(1-4)-D-Glc-NAc
<i>Ulex europaeus</i> (UEA) Stechginstersamen	α -L-Fucose
<i>Limulus polyphemus</i> (LPA) Pfeilschwanzkrebs	Sialinsäure
<i>Phaseolus vulgaris</i> (PHA) Gartenbohne	D-GalNAc

2.1.1.5 Biologische Funktion

Die Rolle der Lektine im Herkunftsorganismus ist weitgehend unbekannt.

Den pflanzlichen Lektinen werden so unterschiedliche Aufgaben wie die Funktion als Speicherproteine, pflanzliche

"Antikörper" und Kohlenhydrattransporteure zugeschrieben. Das Lektin von *Lens culinaris* soll eine Rolle im Befruchtungs- und Reifungsprozeß spielen (68).

Bei Bakterien und Viren sollen Lektine wichtig sein für das Anhaften an Zellwände, bei Vertebraten zur Regulation des Glykoproteinstoffwechsels und als Mediatoren der Phagozytose (85).

2.1.1.6 Eigenschaften der Lektine bei der Interaktion mit Zellen

Kohlenhydrate sind ein wichtiger Bestandteil von Zellmembranen und zu 2-10 % an ihrer Zusammensetzung beteiligt. Nach dem "fluid mosaic model" ragen die Kohlenhydrate über eine Oberfläche aus Glycolipiden und Glycoproteinen hinaus und nehmen eine Funktion als Membran- und Rezeptormoleküle wahr (57).

Binden sich Lektine an ihre spezifischen Zucker auf der Zellmembran, so kann dies unterschiedliche Folgen haben.

Die einfachste Form dieser Interaktion ist die Agglutination von Zellen. Dabei bewirken die Lektine eine Art Brückenbildung zwischen den Zellen, die durch Zugabe des konkurrierenden Zuckers blockiert werden kann. Diese Eigenschaft findet Anwendung bei der Typisierung von Blutgruppen und deren Subgruppen. So agglutiniert DBA menschliche Erythrozyten der Gruppe A₁ stärker als solche von A₂. Routinemäßig werden Blutgruppen mit Hilfe der Antikörper A und B aus dem Blutserum

festgestellt. Da aber kein natürlicher Antikörper gegen die Blutgruppe 0 verfügbar ist, stellen die Lektine ein nützliches Werkzeug bei der Blutgruppentypisierung dar (80, 81).

Starke Unterschiede in der Agglutinationsreaktion findet man auch, wenn Lektine mit normalen oder tumorös entarteten, embryonalen oder adulten sowie mitotischen oder interphasischen Zellen reagieren (81).

Manche Lektine bewirken, daß ruhende Lymphozyten sich zu teilen beginnen. Man nennt diese Eigenschaft mitogene Stimulation. Dabei erzeugt das Lektin an der Plasmamembran ein Signal, das in das Zellinnere übermittelt wird und zu einer Reihe biochemischer Reaktionen führt, wie sie in Zellen, die einer aktiven Proliferation unterliegen, üblich sind.

Es werden noch zahlreiche weitere Reaktionen von Zellen auf Lektine beschrieben. Dazu gehören:

- die Inhibition der Phagozytose
- die Blockierung der Proteinsynthese von Zellen durch RCA
- das Verhindern von Wachstum und Wanderung von Tumorzellen
- die Inhibition der Befruchtung eines Eies durch Spermien
- die Induktion der Insulinfreisetzung in den Pankreasinseln
- die Induktion der Histaminfreisetzung aus basophilen Granulozyten und Mastzellen
- die Inhibition von Pilzwachstum (39, 81).

Die Bindungsintensität zwischen dem Lektin und der Zelle ist immer abhängig von der Lektinkonzentration, dem pH, der Dauer der Einwirkung und der Temperatur (81).

2.1.1.7 Verwendung von Lektinen

Lektine werden benutzt zur Markierung und Charakterisierung von Membranoberflächen und stellen hierbei eine geeignete Methode dar, Veränderungen der Zellen, z.B. während der embryonalen Entwicklung, auf molekularer Basis darzustellen.

Mit ihrer Hilfe kann man Tumorzellen, Organzellen und Bakterien typisieren und klassifizieren (85).

Eine schon erwähnte Anwendungsmöglichkeit ist die Blutgruppentypisierung.

2.1.1.8 Methoden zu Lektinbindungsstudien

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Bindung der Lektine an Zelloberflächen darzustellen.

Die einfachste Methode ist der Nachweis der Agglutinationsreaktion, z.B. im System des "hängenden Tropfens" (68). Dabei muß aber bedacht werden, daß Lektine Zellen nicht zwingend agglutinieren müssen. Eine negative Agglutinationsreaktion bedeutet nicht unbedingt, daß sich kein Lektin an die Kohlenhydratstrukturen gebunden hat (34).

Eine andere Möglichkeit ist es, die Lektine selbst zu markieren. Dies kann durch radioaktive Nuklide erfolgen oder durch licht- oder elektronenmikroskopisch nachweisbare Färbereaktionen, z.B. mit Fluorescein, Ferritin oder Biotin. Hierzu zählt man auch die in den hier vorgestellten Versuchen angewandte Methode der Peroxidase-konjugierten Lektine. Dabei

interagiert der Kohlenhydratanteil der Peroxidase (ein Glycoprotein) mit einer oder mehreren unbesetzten Saccharidbindungsstellen des Lektins. Es muß also das Lektin die richtige Zuckerspezifität für die Peroxidase haben. Der nun erhaltene farblose Komplex wird schließlich über eine Behandlung mit 3,3 Diaminobenzidin und H_2O_2 in einen braunen Farbkomplex überführt (68, 81).

2.1.2 Dolichos biflorus-Agglutinin

Das Lektin wird aus dem Samen der Leguminose Dolichos biflorus (Dicke Bohne) gewonnen, wo man es etwa ab dem 27. Tag nach der Blüte isolieren kann. Es befindet sich dort an den Proteinkörpern der Kotyledonen, wo es etwa 10 % des löslichen Proteins dieses Gewebes ausmacht. Vermutlich spielt es eine Rolle als Speicherprotein oder hilft beim Packen und Mobilisieren von Speichermaterial.

DBA bindet sich spezifisch an terminale, nicht reduzierende, α -gebundene N-Acetyl-Galactosamin-Reste (GalNAc) und agglutiniert in dieser Eigenschaft Erythrozyten der menschlichen Blutgruppe A.

Das Lektin, das ein Molekulargewicht von etwa 110000 besitzt, ist als Tetramer mit zwei Untereinheiten aufgebaut, die zwar eine fast identische Struktur besitzen, von denen aber nur die Untereinheit I eine kohlenhydratbindende Aktivität besitzt. Insgesamt verfügt jedes DBA-Molekül über zwei Zuckerbindungsstellen.

DBA enthält einen großen Anteil an Asparaginsäure und Serin, aber kein Cystein oder Methionin. Es besteht zu 2 % aus Hexose (16, 17).

2.2 Sialinsäure

2.2.1 Definition

Der Begriff "Sialinsäure" umfaßt mehr als zwanzig natürliche Derivate der Neuraminsäure.

Diese ist ein saurer Aminozyucker in Pyranose-Form mit neun C-Atomen. Ihr systematischer Name ist 5-Amino-3,5-Dideoxy-D-Glycero-D-Galacto-2-Nonulopyranos-1-ionische Säure. In der Natur findet man die Neuraminsäure nur in substituierter Form mit einem Acetyl- oder Glycolyl-Rest, es können auch die Hydroxylgruppen methyliert oder mit Acetyl-, Lactyl-, Sulfat- oder Phosphatgruppen verestert sein (73, 74).

2.2.2 Vorkommen

Man kann Sialinsäure in den meisten höheren Tieren von den Stachelhäutern aufwärts sowie in einigen Mikroorganismen (Viren, Bakterien und Protozoen) finden. Die meisten Tiere oder Zelltypen besitzen nur eine einzige Sialinsäureart, gewöhnlich N-Acetyl-Neuraminsäure. Man kann aber auch verschiedene Variationen nebeneinander finden wie in der bovinen Submandibulardrüse, wo 14 verschiedene Sialinsäuren

entdeckt wurden.

Die bevorzugte Lokalisation von Sialinsäuren ist die äußere Zellmembran, wo diese Zucker häufig in hohen Konzentrationen als Komponenten von Glycoproteinen, Gangliosiden oder Polysacchariden vorkommen. So wird z.B. die elektronegative Ladung bereits eines einzigen humanen Erythrozyten durch einen Mantel von über zwanzig Millionen Sialinsäuremolekülen verursacht.

Auch die Glycoproteine von Serum und Schleim sowie Oligosaccharide von Urin und Milch enthalten vielfach Sialinsäure.

Dabei sind die Moleküle meist α -glycosidisch an verschiedenen Positionen anderer Zucker gebunden, vor allem an Galactose oder N-Acetylgalactosamin (GalNAc) und selten an N-Acetyl-Glucosamin oder Sialinsäure selbst.

Innerhalb des Makromoleküls erfolgt die Bindung meist in terminaler Position, und zwar vor allem $\alpha(2-3)$ glycosidisch an Galactose oder $\alpha(2-6)$ glycosidisch an Galactose oder GalNAc. Außerdem kann man die Sialinsäure noch in terminaler Seitenkettenposition oder - vorwiegend bei Bakterien - als interne Sialinsäure zwischen zwei Zuckern in Oligosialylglycokonjugaten und Sialylpolysacchariden finden. Die Art der Bindung scheint enzymatische Reaktionen zu beeinflussen, so auch den Abbau von sialysierten Glycokonjugaten. Beispielsweise werden $\alpha(2-3)$ glycosidische Bindungen viel schneller als $\alpha(2-6)$ Bindungen hydrolysiert. Bei 4-O-acetylierter Sialinsäure sind alle Sialidasen völlig inaktiv (73, 74).

2.2.3 Biologische Funktion

Entfernt man die Sialinsäure enzymatisch, so führt dies zu einem veränderten biologischen Verhalten von Zellen und Molekülen, ein Hinweis für die Bedeutung dieses Zuckers.

Den Sialinsäureresten werden fünf Hauptfunktionen zugeschrieben:

1. Durch die elektronegative Ladung der Sialinsäure werden sowohl eine Aggregation von Zellen über Ca^{2+} -Brücken als auch eine Disaggregation von Zellen durch gegenseitige Abstoßung vermittelt. Bindung und Transport positiv geladener Teile werden beeinflusst (73, 74).
2. Die Bindung von Sialinsäure nimmt Einfluß auf die makromolekulare Struktur von Glycoproteinen. Dies ist bedeutsam für deren korrekte Anordnung auf der Zellmembran, die Aktivität von Glycoprotein-Enzymen und die Resistenz gegenüber Proteasen (22). Dadurch gewinnt die Sialinsäure auch eine Funktion bei der Verhinderung der Ausbreitung von Bakterien in infiziertem Gewebe (73, 74).
3. An der Zelloberfläche kann Sialinsäure die Funktion einer antigenen Determinante besitzen (73, 74).
4. Oft bildet sie auch eine Komponente von Rezeptoren, z.B. für Peptidhormone, Toxine oder Viren. Beispielsweise verhindert Neuraminidase an isolierten Zellen die cAMP-Antwort auf ACTH-Stimulation. Sialinsäure scheint hier also eine wichtige Rolle in der Informationsübertragung zu spielen (67, 74).

5. Eine ihrer wichtigsten Aufgaben liegt in in der Maskierung von Rezeptoren oder antigenen Determinanten. Dies wird an folgenden Beispielen deutlich:

- Der Trophoblast besitzt eine Glycoproteinschicht mit hohem Sialinsäureanteil, die als Immunbarriere zwischen dem Embryo und der Mutter wirkt.
- Im Organismus gibt es sogenannte immunologisch privilegierte Bereiche. Diese unterscheiden sich vom übrigen Organismus dadurch, daß ihre Blut-Gewebe-Schranke besonders undurchlässig ist und eine gewisse Abgrenzung vom immunologischen System des Körpers bildet. Zu diesen Gebieten gehören die vordere Augenkammer, Linse, Hoden, Gehirn, Schilddrüse und Bindegewebe. Gerade hier besteht ein sehr hoher Gehalt an Sialo-Glycokonjugaten. Diese Gewebe und Organe sind es auch, in denen Autoimmunkrankheiten am häufigsten vorkommen. Die Ursache hierfür könnte womöglich in der Demaskierung von antigenem Material durch bakterielle oder virale Neuraminidasen liegen.
- Entfernt man die Sialinsäure von Erythrozyten, so werden diese rasch aus der Blutstrombahn eliminiert, indem sie in der Milz, der Leber und von peritonealen Makrophagen gebunden und phagozytiert werden. Diese Reaktion wird durch ein Lektin vermittelt, das auf der Oberfläche der Makrophagen sitzt und die freigewordenen Galactose- oder GalNAc-Reste erkennt.

Bei all diesen Beispielen scheint die Maskierung der Rezeptoren in der Weise zu funktionieren, daß das große,

negativ geladene Molekül zusammen mit einer Oligosaccharidkette den Polypeptid-Anteil eines Glycoproteins bedeckt oder eine Konformationsänderung des Glycoproteins bewirkt (73, 74).

2.2.4 Neuraminidase

Hinter der Bezeichnung Neuraminidase, Sialidase oder N-Acetylneuraminosyl-glycohydrolase verbirgt sich eine große Zahl von Enzymen von unterschiedlicher Substratspezifität und Vorkommen. Neuraminidasen findet man in zahlreichen Mikroorganismen, Protozoen, Pilzen und Vertebraten. Sie spalten α -glycosidisch gebundene Sialinsäurereste bei einem pH-Optimum von 5-6 ab. Dabei besteht eine unterschiedliche Substratspezifität der Enzyme, die wie bei der Neuraminidase von *Clostridium perfringens* sehr weit sein kann oder sehr eng wie bei der lysosomalen, gangliosid-spezifischen Sialidase der menschlichen Leber. Manche Neuraminidasen brauchen divalente, kationische Kofaktoren wie Ca^{2+} und werden entsprechend durch die Zugabe von EDTA gehemmt. Dies trifft bei der Neuraminidase von *Vibrio cholerae* und manchen Influenzaviren zu. Die Inhibition der Enzymaktivität kann außerdem kompetitiv durch Zugabe des konkurrierenden Zuckers erfolgen (74).

3. MATERIAL UND METHODE

3.1 Versuchstiere

Die Haltung der Tiere erfolgte in Makrolonkäfigen (27/21/15 cm) in vollklimatisierten Räumen, wobei eine Temperatur von 23°C und eine Luftfeuchtigkeit von 85 % herrschte. Die Räume wurden von 6 bis 18 Uhr künstlich beleuchtet. Die Fütterung erfolgte mit Altromin-Preßfutter und Wasser ad libitum.

Die Tiere wurden jeweils morgens um 10 Uhr gepaart, drei Stunden später wurden die belegten Mäuse durch Kontrolle des entstandenen Vaginalpfropfes ermittelt und abgesondert. Der auf die Paarung folgende Tag wurde als Tag 1 post conceptionem (p.c.) gerechnet.

Untersucht wurden jeweils 10 bis 15 juvenile Mäuse des Stammes NMRI der GSF Neuherberg vom 12. Tag p.c. bis zum 13. Lebenstag, ferner wurden einige ausgewählte Organe von älteren und adulten Mäusen entnommen. Dazu wurden die Muttertiere am Untersuchungstag um 10 Uhr durch Genickbruch getötet und die Feten dem Uterus entnommen. Die Feten der letzten Gestationstage und die juvenilen Mäuse wurden durch Atherintoxikation getötet.

3.2 Präparation und Herstellung der histologischen Schnitte

Die Fixation der Versuchstiere erfolgte in 7,5 %igem Formalin für zwei bis sechs Wochen.

Zum Einbetten wurden die Tiere sagittal durchtrennt, ab dem

ersten Lebenstag zusätzlich der Kopf abgesetzt. Vom fünften Lebenstag an wurden die Brust- und Bauchorgane entnommen und getrennt präpariert.

Das Formalin wurde durch zwölfstündiges Wässern ausgewaschen. Die Durchtränkung der Präparate mit Paraffin erfolgte automatisch in einem geschlossenen Einbettssystem (Shandon Hypercenter II), wobei über eine aufsteigende Alkoholreihe die Präparate zunächst mit Methylbenzoat, Benzol und nachfolgend mit Paraplast Plus (Shandon) durchtränkt wurden.

Von den Objekten wurden mit einem Mikrotom Einzelschnitte von jeweils 7 μm Dicke in fünf bis sechs verschiedenen Ebenen in sagittaler Richtung angefertigt. Diese wurden mit der Eiweißglycerin-Wassermethode auf Objektträger aufgeklebt und nach dem Trocknen in Xylol entparaffiniert sowie über eine fallende Alkoholreihe in PBS (phosphate buffered saline, pH 7,4) übertragen.

3.3 Lektinfärbung

Dolichos biflorus-Agglutinin (DBA), konjugiert mit Meerrettichperoxidase (HRP), wurde bezogen von SIGMA Chemie GmbH, Deisenhofen.

Zur Blockade der Aktivität intrinsischer Peroxidase wurden die Objektträger zunächst 10 min in 100 ml PBS mit 2 ml 0,1 %iger H_2O_2 inkubiert und dann mehrmals in PBS gewaschen. Danach wurden die Präparate in eine feuchte Kammer gelegt und mit einer Lösung aus 0,02 mg DBA-HRP/ml PBS beträufelt. Nach 30

min wurden die Präparate in PBS ausgewaschen. Zur Sichtbarmachung des konjugierten Lektin-Peroxidase-Komplexes wurden die Objektträger nun 15 min inkubiert in einer Lösung aus 50 mg 3,3 Diaminobenzidin (DAB) und 0,2 ml H_2O_2 (0,1 %) in 100 ml Trispuffer. Danach wurden sie mit Trispuffer ausgewaschen und über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert. Der Alkohol wurde durch Xylol entfernt, die Präparate dann mit Eukitt eingeschlossen.

3.4 Kontrollfärbung

D-N-Acetylgalactosamin (GalNAc) von SIGMA diente als Zusatz zum Inkubationsmedium zur Überprüfung der kompetitiven Hemmbarkeit der DBA-Peroxidase-Affinitätsreaktion.

Es wurden einige Präparate mit DBA-HRP inkubiert, dem 0,2 M GalNAc zugesetzt worden war. Alle übrigen Schritte entsprachen denen des experimentellen Färbegangs.

3.5 Gegenfärbung

Verschiedene Präparate wurden mit Cresylechtviolett gegengefärbt. Verwendet wurde hierzu eine 0,1 %ige Lösung in 100 %igem Alkohol. Zur Gegenfärbung wurden die Objektträger nach DAB-Behandlung und Tris-Waschung für 50 bis 60 sec in die Färbelösung getaucht und in 96 %igem Alkohol differenziert.

3.6 Neuraminidase-Vorbehandlung

Um eine eventuell mögliche Maskierung von DBA-Rezeptoren zu überprüfen (39, 68), wurden neben den allein Lektin-gefärbten Schnitten zusätzlich entsprechende Schnitte in Neuraminidase inkubiert und nachfolgend Lektin-gefärbt. Die Neuraminidase (Typ X, *Clostridium perfringens*) wurde bezogen von SIGMA Chemie GmbH, Deisenhofen. Sie wurde aufgelöst in Natriumacetat-Puffer pH 5,5 (0,5 M Na-acetat, 4 mM CaCl₂ in 11 Aqua dest.).

Zwei Verfahren wurden gewählt:

1. Die oben genannten Schnitte wurden über Nacht bei 37°C in 2 u Neuraminidase / 100 ml Puffer inkubiert, dann in PBS gewaschen und Lektin-gefärbt.
2. Um den Neuraminidase-Effekt nachzuprüfen, wurde folgender "Neuraminidase-Testversuch" unternommen:

Von fünf Präparaten wurden in jede von drei Küvetten jeweils drei aufeinanderfolgende Schnitte gefüllt und in den folgenden Medien inkubiert:

Küvette 1:	250 mg N-Acetylneuraminsäure Typ IV
3 x Schnitte	(SIGMA) in 70 ml Na-Acetatpuffer
A,B,C,D,E	pH 4

Küvette 2:	10 u Neuraminidase in 70 ml
3 x Schnitte	Na-Acetatpuffer pH 5,5
A,B,C,D,E	

Küvette 3: 70 ml Na-Acetatpuffer pH 5,5
3 x Schnitte
A, B, C, D, E

Nach zwei, vier und sechs Stunden wurde je einer der sich gleichenden Objektschnitte aus jeder Küvette entnommen und mit Lektin inkubiert.

3.7 Vorbehandlung mit anderen Enzymen

Ausgewählte Präparate wurden jeweils für drei Stunden bei 37°C in den folgenden Enzymlösungen inkubiert, nachfolgend mit PBS gewaschen und Lektin-gefärbt:

α -Galactosidase (SIGMA):

2 u in 100 ml Puffer aus 1,36 g KH_2PO_4 /100 ml Aqua dest., 2,28 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ /100 ml Aqua dest. im Mischungsverhältnis 2:1, pH 6,5.

β -Galactosidase (SIGMA):

2 u in 100 ml Puffer aus 0,53 g KH_2PO_4 + 1,39 g K_2HPO_4 /100 ml Aqua dest., pH 6,5.

α -Fucosidase (SIGMA):

10 μl (1,4 u/ml) in 100 ml Puffer aus 0,1 M Na-acetat, pH 5,0.

4. E R G E B N I S S E

Im Folgenden sind die lichtmikroskopischen Ergebnisse der Lektin-Färbungen aufgestellt. Dabei wird beschrieben, wieviele Blutgefäße oder andere Zellen angefärbt wurden.

Es gilt also:

-	keine Strukturen	DBA-affin		
+ -	undeutlich	"	"	"
+	vereinzelte	"	"	"
++	zahlreiche	"	"	"
+++	sämtliche	"	"	"
u	unregelmäßig	"	"	"

Die Intensität der Anfärbung wird hierbei vernachlässigt, da sie nach meinen Erfahrungen bei der Anfertigung der histochemischen Reaktion stark schwanken kann. Nahezu konstant bleibt hingegen die Anzahl der mit dem Lektin reagierenden Zellen.

4.1 Haut

(Tabellen 2, 5)

In der Haut blieb die Lektinaffinität auf die Blutgefäße beschränkt. Deren Affinität war schwach (+) und verschwand zum 18./19. Tag p.c. völlig (-).

Nach Neuraminidase-Behandlung waren die Blutgefäße der Haut in allen Entwicklungsstadien stark DBA-positiv (++).

4.2 Muskulatur

(Tabellen 2, 5)

Die Muskelfasern reagierten grundsätzlich DBA-negativ (-). Zahlreiche Endothelien der Blutgefäße wurden zunächst (14. bis 16./17. Tag p.c.) mit DBA dargestellt (++). Diese Reaktion verschwand in den einzelnen Muskelgruppen unterschiedlich schnell, so daß man ab dem 19. Tag p.c. nur noch wenige DBA-positive Gefäße fand (+).

Dagegen färbten sich sämtliche Blutgefäße nach Neuraminidase-Behandlung mit dem Lektin an (++++) und verloren mit zunehmendem Alter der Feten diese Affinität nicht.

4.3 Knochen

(Tabellen 2, 5, Abbildungen 1, 2)

Ab dem 13./14. Tag p.c. fand man DBA-affine Knorpelzellen und Osteoid (++). DBA-positiv waren hierbei solche Knorpelzellen, die im Bereich der Verkalkungspunkte der Knochen lagen. Man fand diese angefärbten Regionen auch noch bei Präparaten vom 13. Lebenstag, jedoch infolge der fortgeschrittenen Ossifikation nur noch an wenigen Knochen (+), z.B. am Os palatinum. Das Osteoid verlor um den 18. Tag p.c. die DBA-Affinität (-). Ab dem 14. Tag p.c. fand man weiterhin vereinzelte Gefäße des Periosts sowie der Intervertebralgefäße, nicht aber der Spongiosa, DBA-positiv (+).

Behandelte man die Präparate mit Neuraminidase, so ging die Anfärbbarkeit an Knorpel und Osteoid verloren (-). Dafür waren ab dem 15. Tag p.c. die Blutgefäße der Spongiosa stark DBA-positiv (++). Ab dem 3./5. Lebenstag wurde diese Färbereaktion schwach (+) bis undeutlich (+-). Die Gefäße des Periosts sowie die Intervertebralgefäße waren beginnend am 13./14. Tag p.c. deutlich DBA-affin (++) .

4.4 Herz und Aorta

(Tabellen 2, 5)

Während man im Myokard erst vom 3. Lebenstag an vereinzelt DBA- positive Blutgefäße fand (+-), war das Endothel der Aorta regelmäßig stark DBA-positiv (++) . Diese Lektinaffinität konnte man auch fleckförmig am Endokard des linken Herzens wiederfinden (+) .

Die Neuraminidase-Behandlung verstärkte die Anfärbung der Aorta noch zusätzlich (+++). Am 12. bis 15. Tag p.c. fand man innerhalb des Myokards einige (+), bis zum 3. Lebenstag zahlreiche (++) und danach sämtliche Blutgefäße DBA-affin (+++) .

4.5 Nasenhöhlen

(Tabellen 2, 5, Abbildung 3)

Ab dem 18. Tag p.c. färbten sich einige Neuronen des

olfaktorischen Epithels an (+-, +). Die Blutgefäße, bis zum 18. Tag p.c. schwach DBA-positiv (+), wurden nun undeutlich DBA-affin (+-).

Inkubierte man die Präparate mit Neuraminidase, so traten DBA-positive Neuronen ab dem 16. Tag p.c. auf (+) und wurden dann immer zahlreicher (++). Die Blutgefäße reagierten bis zum 18. Tag p.c. stark (++), dann schwach DBA-positiv (+).

4.6 Trachea

(Tabellen 2, 5)

In der Trachea waren die Blutgefäße die einzigen DBA-affinen Strukturen. Man fand sie ab dem 15. Tag p.c. in geringer (+), nach Neuraminidase-Behandlung in großer Anzahl (++) in der Trachealwand.

4.7 Lunge

(Tabellen 2, 5, Abbildung 5)

An den Epithelien der Bronchuli wurden durch Neuraminidase DBA-Bindungsstellen freigelegt. Man sah ab dem 3. Lebenstag eine Anfärbung im Bereich der luminalen Zellmembran (++), wodurch sich ein "Strichmuster" im Schnittbild ergab.

Unter den Blutgefäßen hatten ab dem 13./14. Tag p.c. die Endothelien der größeren Arterien zahlreiche DBA-Bindungsstellen. Deren starke Anfärbbarkeit (++) war ab dem

19. Tag p.c. schwächer ausgeprägt (+), blieb aber bei Neuraminidase-Inkubation weiterhin deutlich vorhanden (++). Zusätzlich wurden nach Neuraminidase-Behandlung die Kapillaren der Bronchien und Bronchuli DBA-positiv (++).

4.8 Zähne

(Tabellen 2, 5)

DBA zeigte ohne Vorbehandlung erst in den Neonatalstadien ein spezifisches Affinitätsmuster. So wurden ab dem 3./5. Lebenstag die Odontoblasten wie auch die Blutgefäße der Pulpa schwach DBA-positiv (+). Ab dem 13. Lebenstag war der Zahnschmelz deutlich angefärbt (+++).

Behandelte man die Präparate mit Neuraminidase, so wurden DBA-Bindungsstellen schon in früherem Alter erfaßt. DBA-positive Odontoblasten konnte man ab dem 18. Tag p.c. in geringer (+-), ab dem 5. Lebenstag in großer Anzahl finden (++). Auch hier war der Zahnschmelz am 13. Lebenstag stark DBA-affin. Die Gefäße der Pulpa färbten sich schon ab dem 16. Tag p.c. vereinzelt (+) und ab dem 19. Tag p.c. mit zunehmender Häufigkeit an (++).

4.9 Speicheldrüsen

4.9.1 Submandibulardrüse

(Tabellen 2, 5)

Vom 16. bis 19. Tag p.c. fand man in verschiedenen Drüsenlumina ein DBA-affines Sekret (+). Blutgefäße waren ab dem 14./15. Tag p.c. DBA-positiv (+).

Nach Neuraminidase-Inkubation stellte sich das Sekret vom 16. bis 19. Tag p.c. deutlicher (++) dar. Die Blutgefäße waren bis zum 15. Tag p.c. häufig (++), dann seltener DBA-positiv (+).

4.9.2 Sublingualdrüse

(Tabellen 2, 5, Abbildung 6)

Die Sublingualdrüse erschien ab dem 16. Tag p.c. im Schnittbild. Ab diesem Tag fand man ein DBA-affines Sekret in den Drüsenlumina (+) und ab dem 17. Tag p.c. viele Drüsenzellen, in denen ein granulierter Inhalt mit dem Lektin reagierte (++). Die Blutgefäße waren am 16. Tag p.c. kräftig (++), dann schwach DBA-positiv (+).

Die Vorbehandlung mit Neuraminidase verstärkte die Befunde an den Drüsenlumina (++), während die Affinität der Drüsenzellen und Blutgefäße sich nicht veränderte.

4.9.3 Parotis

(Tabellen 2, 5)

Die Parotis war am 19. Tag p.c. zum ersten Mal in den Präparaten dargestellt.

Während das Parenchym grundsätzlich DBA-negativ reagierte (-), waren ab dem 3. Lebenstag vereinzelte (+), nach Neuraminidase-Behandlung zahlreiche (++) Blutgefäße DBA-positiv.

4.10 Magen

(Tabellen 2, 5, Abbildung 7)

Mit zunehmender Differenzierung der Magenwand wurden am 3. Lebenstag in der Pars glandularis nicht näher identifizierbare Drüsenzellen deutlich DBA-positiv (++) . In der Pars nonglandularis fand man eine DBA-affine Schicht von Hornzellen (++) . Die Blutgefäße der Magenwand waren lediglich in der Zeit vom 12. bis zum 18. Tag p.c. schwach gefärbt (+) .

Behandelte man die Präparate mit Neuraminidase, so wurde die Affinität der Horn- und Drüsenzellen nicht verändert. Die Blutgefäße wurden jedoch bis zum 19. Tag p.c. stark (++) , danach schwach (+) DBA-positiv.

4.11 Darm

(Tabellen 2, 5, Abbildung 8)

Unter den Parenchymzellen des Darmes waren nur die Duodenaldrüsen der adulten Tiere DBA-positiv (++). Die Blutgefäße des Darmes waren bis zum 17. Tag p.c. insgesamt schwach angefärbt (+); danach reagierten allein die Dünndarmgefäße noch gering mit dem Lektin (+). Die Gefäße des Dickdarms wurden DBA-negativ (-).

Unter Neuraminidase-Behandlung waren die Duodenaldrüsen bereits am 13. Lebenstag anfärbbar (++). Die Blutgefäße waren bis zum 19. Tag p.c. in allen Darmteilen deutlich angefärbt (++), danach wurden sie mit Ausnahme der Dünndarmgefäße (++) schwächer DBA-positiv (+).

4.12 Pankreas

(Tabellen 3, 6, Abbildung 8)

Das Parenchym des Pankreas besaß keine DBA-Affinität (-). Die Blutgefäße zeigten eine allgemein schwache (+), nach Neuraminidase-Inkubation deutliche DBA-Affinität (++).

4.13 Leber

(Tabellen 3, 6, Abbildung 8)

Das Lebergewebe zeigte grundsätzlich keine Affinität zu

DBA (-). Lediglich das Epithel des Ductus choledochus ließ sich lumenseitig deutlich (++), an den übrigen Zellmembranabschnitten etwas undeutlicher anfärben. Diese Affinität wurde durch Neuraminidase-Inkubation nicht verändert.

(Der Gallengang war nur in Präparaten vom 16. und 18. Tag p.c. auffindbar.)

4.14 Lymphknoten

(Tabellen 3, 6)

An den Lymphknoten an Kopf und Hals erwiesen sich Parenchym wie auch Blutgefäße DBA-negativ (-); Neuraminidase bewirkte aber am 3. bis 5. Lebenstag eine Anfärbbarkeit einzelner Blutgefäße (+).

(Andere Stadien wurden nicht untersucht.)

4.15 Thymus

(Tabellen 3, 6, Abbildung 9)

Im Thymus färbten sich nicht näher identifizierbare Zellen bis zum 14. Tag p.c. schwach (+), bis zum 17. Tag p.c. undeutlich (+-) und danach nicht mehr an (-). Die Blutgefäße waren bis zum 17. Tag p.c. schwach (+) bis undeutlich (+-) DBA-positiv, dann negativ (-).

Nach Inkubation mit Neuraminidase nahm die Zahl der

angefärbten Parenchymzellen zu (++), aber auch hier verschwand die Affinität zu DBA mit dem 17. Tag p.c. (-). Dagegen fand man in jedem Alter der Tiere einige DBA-positive Gefäße (+).

4.16 Milz

(Tabellen 3, 6)

In der Milz fand man keine DBA-affinen Strukturen (-).

4.17 Nieren

(Tabellen 3, 6, Abbildungen 10, 11)

Die Nieren zeigten ein insgesamt sehr uneinheitliches Bild. Immer wieder färbten sich einige Tubulusepithelien, Arterien oder Glomerulumschlingen an. Dabei ließ sich aber keinerlei Regelmäßigkeit erkennen (u).

Bei den adulten Tieren trat jedoch in der Lektinbindung ein deutlicher Geschlechtsdimorphismus auf. Während die Nieren der Männchen weiterhin sehr unregelmäßig mit DBA reagierten (u), wurden im Nierenmark der Weibchen nach Neuraminidase-Behandlung zahlreiche Epithelzellen der Sammelrohre DBA-positiv (++).

4.18 Harnblase

(Tabellen 3, 6)

Die DBA-Affinität beschränkte sich auf die Blutgefäße der Blasenwand, die zunächst deutlich (++), mit dem 18. Tag p.c. aber schwächer DBA-positiv (+) und dann völlig DBA-negativ waren (-).

Einen entsprechenden Verlauf fand man auch nach Neuraminidase-Inkubation. Hier besaßen die Gefäße zunächst eine starke DBA-Affinität (++), die ab dem 17. Tag p.c. abnahm und dann nur noch schwach (+) vorhanden war.

4.19 Hoden, Nebenhoden

(Tabellen 3, 6, Abbildung 12)

Hoden und Nebenhoden erschienen am 16. Tag p.c. zum ersten Mal im Schnittbild. Ab diesem Zeitpunkt reagierte das Epithel der Nebenhodenkanäle DBA-positiv (++). Dabei fand man an der gesamten Zellmembran, vor allem aber an der Luminalseite eine deutliche Lektinaffinität. Beim adulten Tier war auch der Inhalt der Nebenhodenkanäle angefärbt (++). Die Blutgefäße waren in Hoden und Nebenhoden bis zum 5. Lebenstag schwach DBA-positiv (+), dann negativ (-).

Nach Neuraminidase-Inkubation fand man in jedem Stadium einige DBA-positive Blutgefäße (+). Die übrigen Befunde glichen der ausschließlichen DBA-Behandlung.

4.20 Ovarien, Eileiter

(Tabellen 3, 6, Abbildungen 13-16)

DBA färbte das Zytoplasma der Oozyten vom 15. Tag p.c. bis zum 3. Lebenstag schwach (+), danach kaum mehr an (+-). Im selben Zeitraum waren einige Blutgefäße des Mesovars DBA-positiv (+) und nach dem 3. Lebenstag nahezu negativ (+-). Die epitheliale Auskleidung der Eileiter reagierte bis zum 5. Lebenstag deutlich (++), dann schwächer (+) mit dem Lektin.

Nach der Inkubation mit Neuraminidase fand man regelmäßig viele (++) DBA-positive Blutgefäße im Mesovar wie auch im Ovar. Das Eileiterlumen blieb stark DBA-positiv (++). Größere Unterschiede waren an den Oozyten zu sehen: Deren Zytoplasma war bis zum 3. Lebenstag DBA-negativ (-) und färbte sich dann stark an (++). Dabei sah man eine helle, homogene Färbung des Zytoplasmas mit kleinen, stark angefärbten Granula.

Das Zytoplasma der Oozyten war also nach Neuraminidase-Behandlung von dem Zeitpunkt an DBA-positiv, an dem es ohne Vorbehandlung DBA-negativ wurde.

4.21 Rückenmark

(Tabellen 3, 6)

Das Parenchym des Rückenmarks zeigte keine DBA-Affinität (-). Am 12. Tag p.c. waren noch einige Kapillaren im kaudalen Rückenmark DBA-positiv (+), danach färbten sie sich nicht mehr an (-).

Die Lektinbindung war nach Inkubation in Neuraminidase deutlicher zu erkennen (++), aber auch hier wurden ab dem 13. Tag p.c. immer weniger (+) und danach keine Gefäße mehr angefärbt (-).

4.22 Gehirn

(Tabellen 3, 6, Abbildung 4)

Ohne Vorbehandlung waren im Gehirn keine Parenchymzellen DBA-affin (-). Die Kapillaren des Plexus chorioideus waren bis zum 14. Tag p.c. stark angefärbt (++), ihre Affinität nahm dann ab (+) und war ab dem 17./18. Tag p.c. nur noch undeutlich vorhanden (+-). Am 12. und 13. Tag p.c. waren im Telenzephalon einige DBA-positive Blutgefäße zu finden (+), während die übrigen Hirnregionen fast vollständig DBA-negativ waren (+-). Ab dem 15. Tag p.c. war die Anfärbbarkeit der Kapillaren verschwunden (-).

Inkubierte man die Präparate in Neuraminidase, so fand man ab dem 19. Tag p.c. im Bulbus olfactorius einzelne DBA-positive Glomeruli (+). Die Blutgefäße des Plexus chorioideus färbten sich bis zum 14. Tag p.c. stark (++), dann schwach DBA-positiv (+). Im Telenzephalon waren bis zum 13. Tag p.c. die Blutgefäße stark (++), in den anderen Gehirnregionen schwach angefärbt (+). Diese DBA-Affinität wurde auch hier zunehmend schwächer, so daß am 14. Tag p.c. nur noch das Telenzephalon schwach DBA-positiv (+) und danach wie die anderen Regionen DBA-negativ (-) reagierte.

4.23 Meningen

(Tabellen 4, 7)

In den Meningen waren allein die Blutgefäße DBA-positiv. Die Kapillaren zeigten eine deutliche DBA-Affinität (++) in den Regionen, wo auch die Kapillaren des Gehirns bzw. des Rückenmarks DBA-positiv waren. Verschwand deren Anfärbbarkeit, so fand man nur noch die größeren Blutgefäße DBA-positiv (+), die Kapillaren wurden DBA-negativ (-).

Diese Beobachtung war unverändert auch nach Neuraminidase-Inkubation zu machen.

4.24 Ganglien

(Tabellen 4, 7)

Die Ganglienzellen der Cerebral- und Spinalganglien besaßen keine Lektinaffinität (-). Einige Blutgefäße waren jedoch bis zum 13. Tag p.c. DBA-positiv (+), dann DBA-negativ (-).

Neuraminidase verursachte eine deutliche Affinität der Gefäße zu DBA (++) , die auch in der weiteren Entwicklung der Tiere erhalten blieb.

4.25 Augen

(Tabellen 4, 7)

Bis zum 18. Tag p.c. waren die der Arteria hyaloidea

entspringenden Kapillaren an Linse und Retina sowie die Blutgefäße der Pigmentschicht schwach DBA-positiv (+).

Durch Neuraminidase-Inkubation wurden weitere Bindungsstellen freigelegt, so daß man bis zum 19. Tag p.c. viele dieser Kapillaren DBA-positiv fand (++) . Danach verschwand die Lektinaffinität der Linsen- und Retinagefäße wieder (-), während in der Pigmentschicht noch bis zum 5. Lebenstag zahlreiche (++) , dann weniger (+) angefärbte Kapillaren zu sehen waren.

4.26 Ohren

(Tabellen 4, 7, Abbildung 17)

Ab dem 16. Tag p.c. konnte man in der Cochlea über der Anlage des Cortischen Organs eine DBA-positive Membran erkennen (+). Mit zunehmender Differenzierung des Organs entstand aus dieser Membran die ebenfalls DBA-positive Membrana tectoria, die man ab dem 18. Tag p.c. erkennen konnte (++) . Ab dem 3. Lebenstag färbten sich auch die Zellen des Limbus spiralis an und blieben in der weiteren Entwicklung DBA-positiv (++) , während die Membrana tectoria am 9. Lebenstag wieder DBA-negativ reagierte (-). Die Blutgefäße der Ohren zeigten sich schwach DBA-positiv (+), wobei die endotheliale Auskleidung der Gefäße häufig fleckförmig angefärbt war.

Ähnliche Ergebnisse fand man auch nach Inkubation der Präparate in Neuraminidase, jedoch blieb hier die Membrana tectoria DBA-positiv (++) . Die Blutgefäße waren bis zum 17.

Tag p.c. deutlich (++), dann schwächer und auch hier fleckförmig DBA-affin (+).

4.27 Hypophyse

(Tabellen 4, 7)

Das Parenchym der Hypophyse zeigte keine Lektinaffinität (-). Bis zum 15. Tag p.c. fand man in der Adenohypophyse einige DBA-positive Blutgefäße (+). Danach reagierte die Hypophyse DBA-negativ (-).

Die Neuraminidase-Behandlung verursachte an der Adenohypophyse zunächst bis zum 14. Tag p.c. eine deutliche Anfärbung der Blutgefäße (++), die bis zum 18. Tag p.c. schwächer wurde (+) und dann ganz fehlte (-). Mit der beginnenden Proliferation der Neurohypophyse am 18. Tag p.c. fanden sich hier einige DBA-positive Blutgefäße (+), die auch am 13. Lebenstag noch angefärbt wurden (+).

4.28 Schilddrüse

(Tabellen 4, 7, Abbildungen 18, 19)

An der Schilddrüse trat ab dem 3. Lebenstag eine deutlicher werdende Lektinaffinität an den Blutgefäßen auf (+, ++), die übrigen Strukturen waren nicht mit DBA darstellbar (-).

Inkubierte man die Präparate in Neuraminidase, so wurde das Lektin ab dem 17. Tag p.c. (+) zunehmend stärker an die

Kapillaren gebunden, so daß ab dem 9. Lebenstag sämtliche Kapillaren DBA-positiv reagierten (+++).

4.29 Nebennieren

(Tabellen 4, 7)

Als DBA-affine Strukturen fand man in der Nebenniere bis zum 14. Tag p.c. etliche angefärbte Blutgefäße (++) , nach Neuraminidase-Behandlung war dies bis zum 19. Tag p.c. der Fall.

4.30 Kontrollreaktionen zur DBA-HRP-Histochemie

Die Spezifität der Reaktion wurde durch Zusatz von N-Acetylgalactosamin zum Lektin-Inkubationsmedium bestätigt. Unter diesen Bedingungen war keines der Präparate in der Peroxidase-Reaktion anfärbbar.

4.31 Neuraminidase-Testversuch

In allen Küvetten trat die endgültige Wirkung schon nach zwei Stunden ein, danach waren die Ergebnisse konstant.

Die Präparate aus den verschiedenen Küvetten glichen sich fast völlig und entsprachen in ihrem Affinitätsmuster dem vorher Beschriebenen bei Neuraminidase-Behandlung.

Die Ausnahme bildete hierbei die Lunge. Die bereits beschriebene Affinität der Bronchuli-Epithelien zeigte sich nur dann, wenn der Pufferlösung Neuraminidase zugesetzt wurde. In allen anderen Fällen war das bronchuläre Epithel DBA-negativ (-).

4.32 Vorbehandlung mit anderen Enzymen

Inkubierte man die Präparate in Enzymlösungen aus α -Galactosidase, β -Galactosidase oder α -Fucosidase, so entsprach das DBA-Bindungsmuster dem der Inkubation in reiner Pufferlösung (siehe 4.31).

4.33 Tabellen

Tabelle 2

DBA	12. dpc	13. dpc	14. dpc	15. dpc	16. dpc	17. dpc	18. dpc	19. dpc	3. dpn	5. dpn	9. dpn	13. dpn	adult
4.1 Haut:													
Epidermis-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	./.
schichten													
Blutgefäße	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	./.
4.2 Muskulatur:													
Muskelfasern	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Blutgefäße	./.	./.	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+
4.3 Knochen:													
Knorpelzellen	-	+	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	./.
Osteoid	-	-	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	./.
Blutgefäße Mark	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	./.
Blutgef. Periost	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	./.
4.4 Herz, Aorta:													
Endokard	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Blutgefäße	-	-	-	-	-	-	-	-	+-	+-	+-	+-	+-
Aorta-Endothel	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
4.5 Nasenhöhle:													
Neuronen	-	-	-	-	-	-	+-	-	+	-	+-	+-	./.
Blutgefäße	+	++	+	+	+	+	+	+-	+-	+-	+-	+-	./.
4.6 Trachea:													
Trachealwand	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Blutgefäße	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4.7 Lunge:													
Bronchuli	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arterien	-	+	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+
4.8 Zähne:													
Odontoblasten	./.	./.	-	-	-	-	-	-	+-	+	+	+	./.
Zahnschmelz	./.	./.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	./.
Blutgefäße	./.	./.	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	./.
4.9 Submandibulardrüse:													
Drüsenlumina	./.	./.	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	./.
Blutgefäße	./.	./.	+	+	+-	+-	+	+	+	+	+	+	./.
Sublingualdrüse:													
Drüsenlumina	./.	./.	./.	./.	+	+	+	+	+	+	+	+	./.
Drüsenzellen	./.	./.	./.	./.	++	++	++	++	++	++	++	++	./.
Blutgefäße	./.	./.	./.	./.	++	+	+	+	+	+	+	+	./.
Parotis:													
Parenchym	./.	./.	./.	./.	./.	./.	./.	-	-	-	-	-	./.
Blutgefäße	./.	./.	./.	./.	./.	./.	./.	-	+	+	+	+	./.

Tabelle 3

[illegible]

Tabelle 4

[illegible]

Tabelle 5

	dpc	dpc	dpc	dpc	dpc	dpc	dpc	dpc	dpc	dpcn	dpcn	dpcn	dpcn	adult
Neuraminidase-DBA	dpc	dpc	dpc	dpc	dpc	dpc	dpc	dpc	dpc	dpcn	dpcn	dpcn	dpcn	adult
4.1 Haut:														
Epidermis-schichten	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/.
Blutgefäße	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	/.
4.2 Muskulatur:														
Muskelfasern	/.	/.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Blutgefäße	/.	/.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
4.3 Knochen:														
Knorpelzellen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/.
Osteoid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/.
Blutgefäße Mark	-	-	-	++	+	++	++	++	+	+/-	+/-	+/-	+/-	/.
Blutgef.Periost	-	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	/.
4.4 Herz, Aorta:														
Endokard	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Blutgefäße	+	+	+	+	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
Aorta-Endothel	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
4.5 Nasenhöhle:														
Neuronen	-	-	-	-	+	++	++	++	++	++	++	++	++	/.
Blutgefäße	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	/.
4.6 Trachea:														
Trachealwand	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Blutgefäße	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
4.7 Lunge:														
Bronchioli	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++
Arterien	-	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
4.8 Zähne:														
Odontoblasten	/.	/.	-	-	-	-	+-	+	++	++	++	++	++	/.
Zahnschmelz	/.	/.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+/.	/.
Blutgefäße	/.	/.	-	-	+	+	+	++	+	++	+	++	+/.	/.
4.9 Submandibulardrüse:														
Drüsenlumina	/.	/.	-	-	++	++	++	++	-	-	-	-	-	/.
Blutgefäße	/.	/.	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/.
Sublingualdrüse:														
Drüsenlumina	/.	/.	/.	/.	+	++	++	++	++	++	++	++	++	/.
Drüsenzellen	/.	/.	/.	/.	+	+	++	++	++	++	++	++	++	/.
Blutgefäße	/.	/.	/.	/.	++	+	+	+	+	+	+	+	+	/.
Parotis:														
Parenchym	/.	/.	/.	/.	/.	/.	/.	-	-	-	-	-	-	/.
Blutgefäße	/.	/.	/.	/.	/.	/.	/.	-	++	++	++	++	++	/.

Tabelle 6

Tabelle 6		12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	19.	3.	5.	9.	13.	adult
Neuraminidase-DBA		dpc	dpc	dpc	dpc	dpc	dpc	dpc	dpc	dpc	dpc	dpc	dpc	
=====														
4.10	Magen:													
	Drüsenzellen	./.	./.	./.	./.	./.	./.	+	++	++	++	++	++	++
	Hornzellen	./.	./.	./.	./.	./.	./.	+	++	++	++	++	++	++
	Blutgefäße	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+

4.11	Darm:													
	Duodenaldrüsen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++
	Dünndarm/ Blutgefäße	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	Dickdarm/ Blutgefäße	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	-

4.12	Pankreas:													
	Parenchym	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	./.
	Blutgefäße	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	./.

4.13	Leber:													
	Parenchym	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	./.
	Ductus choledochus	./.	./.	./.	./.	++	./.	++	./.	./.	./.	./.	./.	./.
	Blutgefäße	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	./.

4.14	Lymphknoten:													
	Parenchym	./.	./.	./.	./.	./.	./.	./.	./.	-	-	./.	./.	./.
	Blutgefäße	./.	./.	./.	./.	./.	./.	./.	./.	+	+	./.	./.	./.

4.15	Thymus:													
	Parenchym	++	++	++	++	+	+	-	-	-	-	-	-	./.
	Blutgefäße	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	./.

4.16	Milz:													
	Parenchym	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	./.
	Blutgefäße	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	./.

4.17	Niere:													
	Tubuli männl.	u	u	u	u	u	u	u	u	u	u	u	u	u
	Tubuli weibl.	u	u	u	u	u	u	u	u	u	u	u	u	++
	Blutgefäße	u	u	u	u	u	u	u	u	u	u	u	u	u

4.18	Harnblase:													
	Parenchym	./.	./.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	./.
	Blutgefäße	./.	./.	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	./.

4.19	Hoden:													
	Parenchym	./.	./.	./.	./.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Blutgefäße	./.	./.	./.	./.	+	+	+	+	+	+	+	+	+

	Nebenhoden:													
	Epithel	./.	./.	./.	./.	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	Sekret	./.	./.	./.	./.	-	-	-	-	-	-	-	-	++
	Blutgefäße	./.	./.	./.	./.	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabelle 7

Neuraminidase-DBA	12. dpc	13. dpc	14. dpc	15. dpc	16. dpc	17. dpc	18. dpc	19. dpc	3. dpn	5. dpn	9. dpn	13. dpn	adult
4.20 Ovar, Eileiter:													
Oozyten	./.	./.	./.	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++
Eileiterepithel	./.	./.	./.	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Blutgefäße	./.	./.	./.	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
4.21 Rückenmark:													
Parenchym	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	./.
Blutgefäße	++	+	+-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	./.
4.22 Gehirn:													
Parenchym	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Blutgefäße	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.23 Meningen:													
Epithel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Blutgefäße	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4.24 Ganglien:													
Parenchym	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	./.
Blutgefäße	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	./.
4.25 Auge:													
Parenchym	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	./.
Linse, Retina													
Blutgefäße	++	++	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-	./.
Pigmentschicht													
Blutgefäße	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	./.
4.26 Ohr:													
Membrana tectoria	./.	./.	-	+	+	+	++	++	++	++	++	++	./.
Limbus spiralis	./.	./.	./.	./.	./.	./.	./.	./.	++	++	++	++	./.
Blutgefäße	./.	./.	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	./.
4.27 Hypophyse:													
Parenchym	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	./.
Blutgefäße													
Adeno-	++	++	++	+	+	+	+	-	-	-	-	-	./.
Neuro-	./.	./.	./.	./.	./.	./.	+	+	+	+	+	+	./.
4.28 Schilddrüse:													
Parenchym	./.	./.	./.	./.	./.	-	-	-	-	-	-	-	-
Blutgefäße	./.	./.	./.	./.	./.	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++
4.29 Nebennieren:													
Parenchym	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Blutgefäße	++	++	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-

4.34 Abbildungen

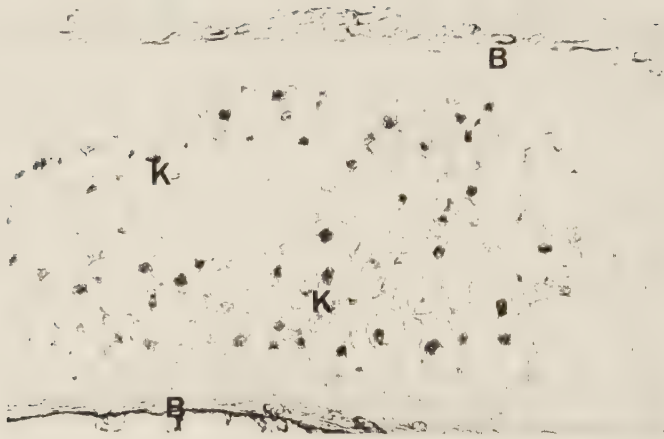


Abbildung 1: Knochen, 17. Tag p.c., DBA-HRP-Reaktion, 560x. Zahlreiche DBA-Rezeptoren an den Knorpelzellen (K) und an den Blutgefäßendothelien (B) des Periosts.



Abbildung 2: Knochen, 17. Tag p.c., Neuraminidase-Vorbehandlung, DBA-HRP-Reaktion, 560x. Stark DBA-positive Blutgefäße (->) in der Spongiosa.



Abbildung 3: Rieschschleimhaut, 9. Lebenstag, Neuraminidase-Vorbehandlung, DBA-HRP-Reaktion, Gegenfärbung Cresylechtviolett, 875x. Etliche Neuronen (->) DBA-positiv.

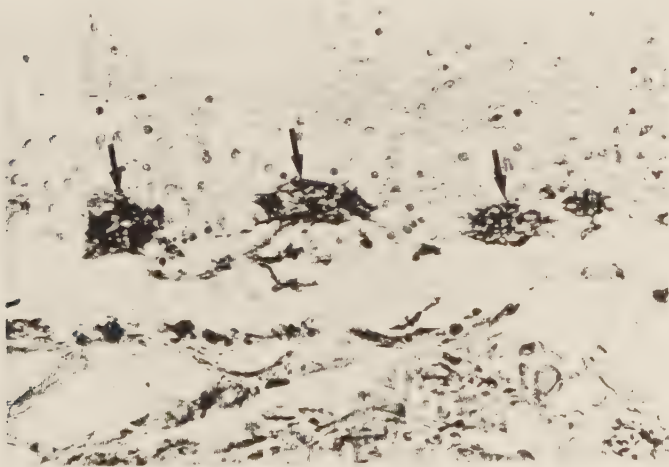


Abbildung 4: Bulbus olfactorius, 5. Lebenstag, Neuraminidase-Vorbehandlung, DBA-HRP-Reaktion, Gegenfärbung Cresylechtviolett, 560x. Mehrere DBA-affine Glomeruli (->).

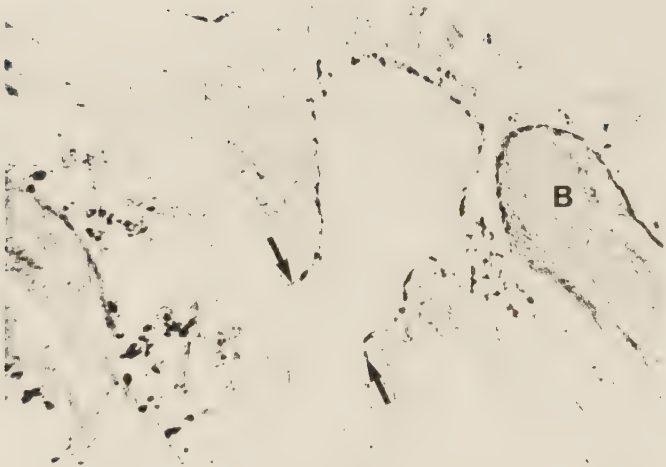


Abbildung 5: Lunge, 13. Lebenstag, Neuraminidase-Vorbehandlung, DBA-HRP-Reaktion, Gegenfärbung Cresylechtviolett, 350x. Starke Epithelaffinität für DBA endet am Übergang vom Bronchulus respiratorius zum Ductulus alveolaris (->), Endothel der größeren Blutgefäße (B) deutlich DBA-affin.



Abbildung 6: Sublingualdrüse, 3. Lebenstag, Neuraminidase-Vorbehandlung, DBA-HRP-Reaktion, Gegenfärbung Cresylechtviolett, 560x. Zahlreiche DBA-affine Drüsenzellen (->).



Abbildung 7: Magenwand, 13. Lebenstag, Neuraminidase-Vorbehandlung, DBA-HRP-Reaktion, Gegenfärbung Cresylechtviolett, 875x. Etliche DBA-positive Drüsenzellen (->).

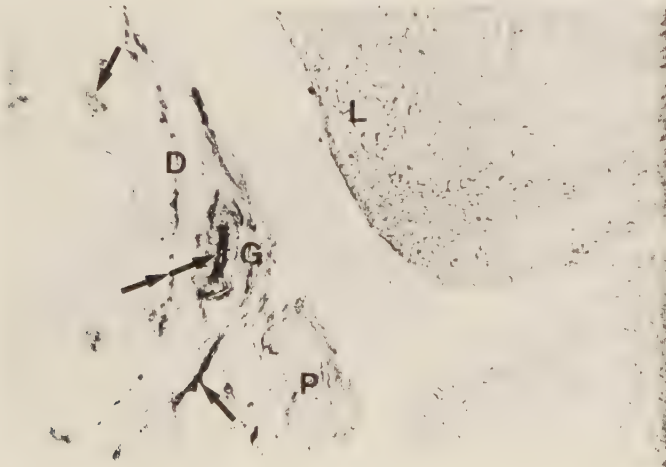


Abbildung 8: Leber (L), Pankreas (P), Dünndarm (D), Gallengang (G), 16. Tag p.c., DBA-HRP-Reaktion, 350x. Blutgefäße in Darm und Pankreas schwach DBA-affin (->). Gallenganglumen stark, Epithel schwach DBA-positiv (-> ->).

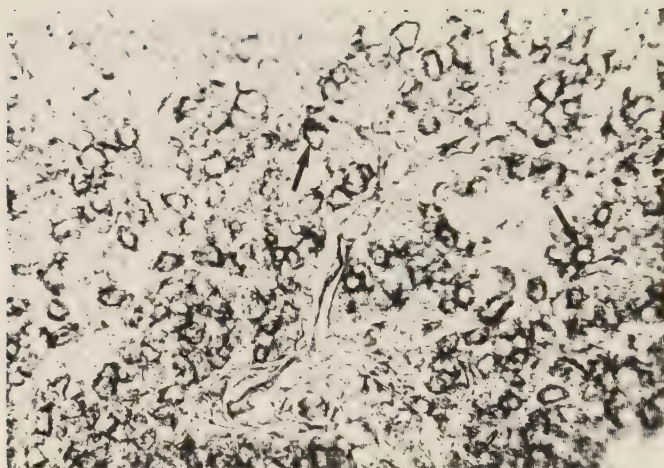


Abbildung 9: Thymus, 14. Tag p.c., Neuraminidase-Vorbehandlung, DBA-HRP-Reaktion, 875x. Zellmembran zahlreicher Thymozyten DBA-positiv (->).

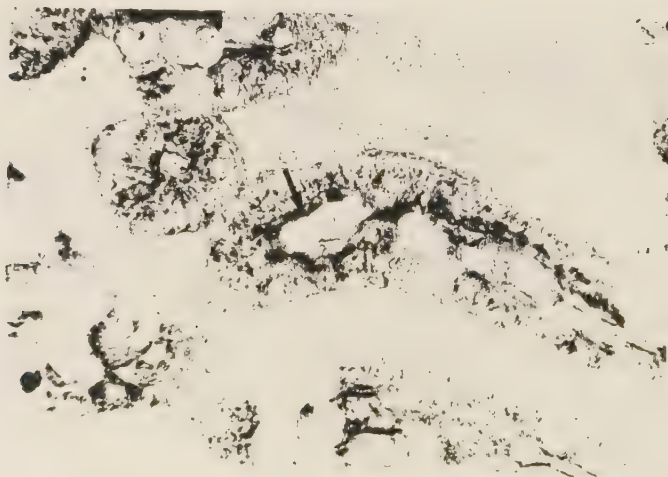


Abbildung 10: Niere, adultes Weibchen. Neuraminidase-Vorbehandlung, DBA-HRP-Reaktion, 875x. Sammelrohrepithel stark DBA-positiv (->).

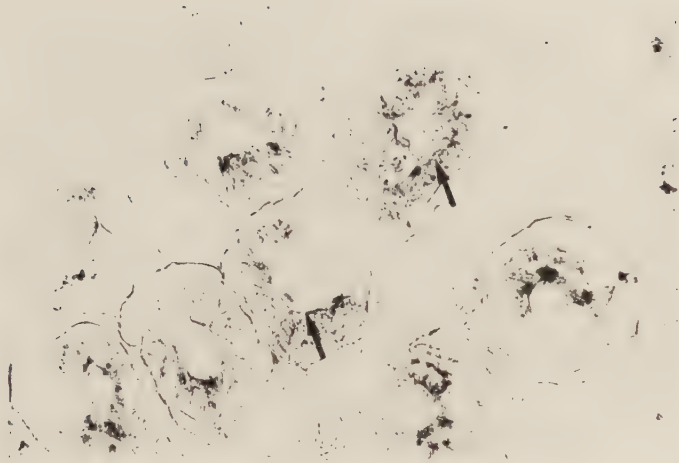


Abbildung 11: Niere, adultes Weibchen, Neuraminidase-Vorbehandlung, DBA-HRP-Reaktion, 875x. Sammelrohrepithel (S) stark DBA-affin.

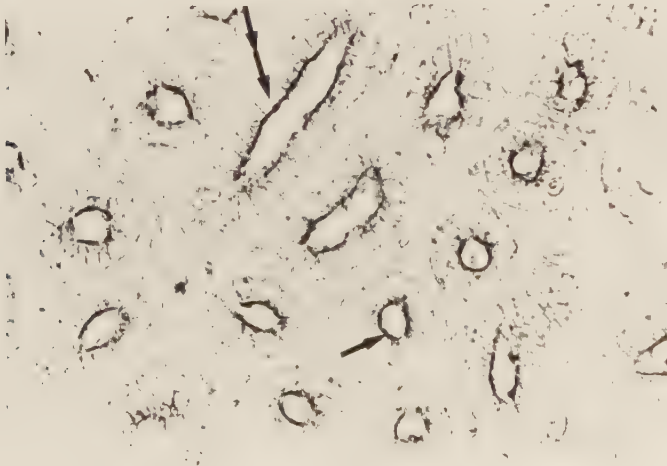


Abbildung 12: Nebenhoden, 13. Lebenstag, Neuraminidase-Vorbehandlung, DBA-HRP-Reaktion, Gegenfärbung Cresylechtviolett, 560x. Lumen der Nebenhodenkanäle (->) stark, Epithel (->->) schwach DBA-affin.

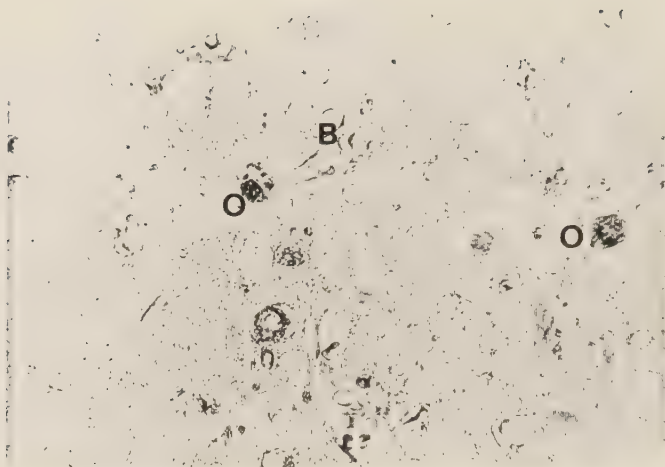


Abbildung 13: Ovar, 17. Tag p.c., DBA-HRP-Reaktion, 875x. Oozyten (O) stark DBA-positiv, Blutgefäße (B) DBA-negativ.

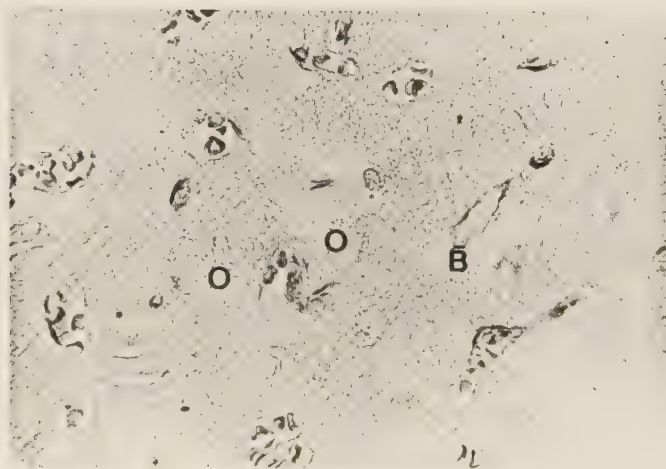


Abbildung 14: Ovar, 17. Tag p.c., Neuraminidase-Vorbehandlung, DBA-HRP-Reaktion, 875x. Oozyten (O) DBA-negativ, Blutgefäße (B) fleckförmig DBA-affin.

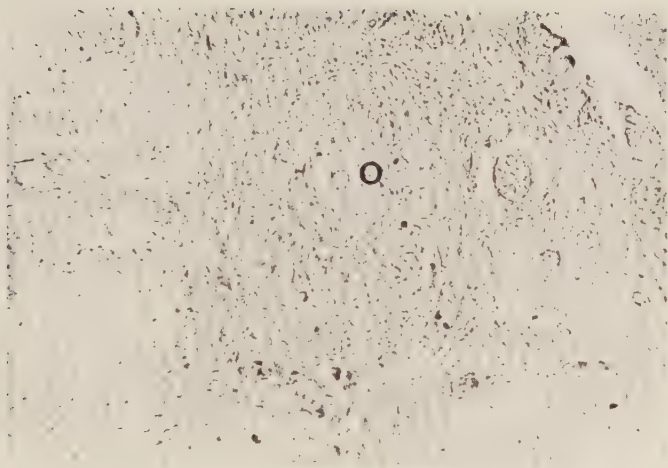


Abbildung 15: Ovar, 9. Lebenstag, DBA-HRP-Reaktion, Gegenfärbung Cresylechtviolett, 875x. Oozyte (O) DBA-negativ.

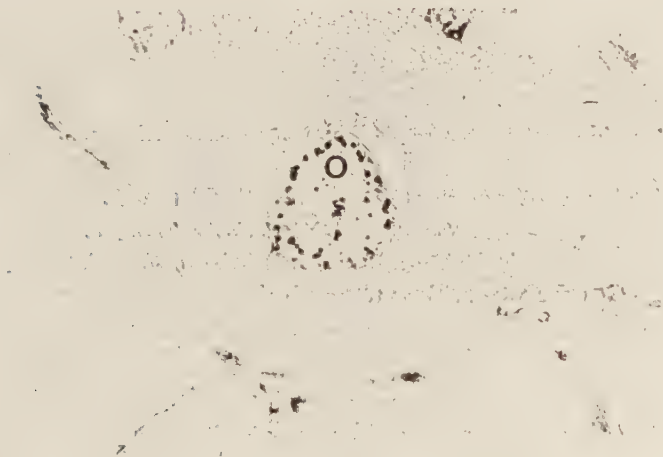


Abbildung 16: Ovar, 9. Lebenstag, Neuraminidase-Vorbehandlung, DBA-HRP-Reaktion, Gegenfärbung Cresylechtviolett, 875x. Granula in der Oozyte (O) deutlich DBA-affin.



Abbildung 17: Gehörgang, 5. Lebenstag, Neuraminidase-Vorbehandlung, DBA-HRP-Reaktion, Gegenfärbung Cresylechtviolett, 350x. Membrana tectoria (M) und Limbus spiralis (L) deutlich DBA-positiv.



Abbildung 18: Schilddrüse, 13. Lebenstag, DBA-HRP-Reaktion, Gegenfärbung Cresylechtviolett, 560x. Blutgefäße (->) schwach DBA-positiv.

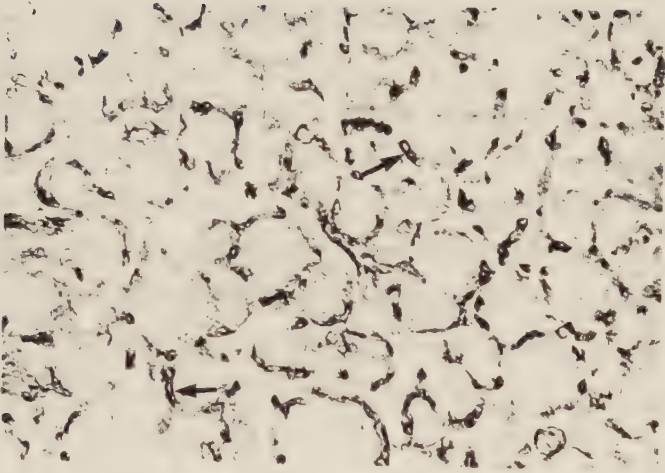


Abbildung 19: Schilddrüse, 9. Lebenstag, Neuraminidase-Vorbehandlung, DBA-HRP-Reaktion, Cresylechtviolett, 560x. Blutgefäße (->) stark DBA-positiv.

5. DISKUSSION

5.1 Aussagekraft der Lektin-Bindungsreaktion

In der vorliegenden Arbeit wurde ein spezifisches Affinitätsmuster der NMRI-Maus für das Dolichos biflorus-Agglutinin nachgewiesen. Dabei wurden formalinfixierte und in Paraffin eingebettete Schnitte untersucht. Das gebundene DBA wurde mittels Meerrettichperoxidase (HRP) dargestellt.

Will man diese Ergebnisse mit anderen Studien vergleichen, so sei auf folgende, einander sich zum Teil widersprechende Aussagen hingewiesen:

1. Fixation:

Jede Fixation hat einen verändernden Einfluß auf das Gewebe. Dabei kann auch die Lektinaffinität verändert werden, so daß Bindungsstellen zerstört, aber auch neu geschaffen werden können.

Bell und Sharon (6) berichten, daß schon durch das Einfrieren von Gewebe die Affinität für bestimmte Lektine zunehmen kann. Die Aldehydfixation zerstörte in ihren Versuchen alle Lektin-Bindungsstellen in der Mäuseepidermis. Leatham und Atkins (36) weisen darauf hin, daß durch die Formalinfixation infolge der Proteindenaturierung eine Kohlenhydratsequestrierung erfolgen kann und bevorzugen Methoden, die mit unfixierten Gefrierschnitten arbeiten. Van der Valk und Hageman (90) erzeugten durch Formalinfixierung sogar mehr UEA-Bindungsstellen als an unfixiertem Gewebe. Eindeutig den Vorrang geben Schulte und Spicer (76, 77) der Fixierung mit $HgCl_2$. In ihren Versuchen erwies sich die Quecksilberfixierung

als die beste, von Carnoy's Flüssigkeit und Formalin gefolgte Methode. Sie berichten über eine Reduzierung von Lektinrezeptoren bis zu deren vollständigen Verlust in formalinfixiertem Gewebe.

2. Einbettung:

Während mehrere Autoren keine Unterschiede in der Lektinaffinität zwischen Gefrier- und Paraffinschnitten feststellen (60, 72, 96), weisen andere (6, 36) darauf hin, daß durch das Paraffin wie auch die nachfolgende Behandlung mit Xylol Glycolipide aus dem Gewebsverband ausgewaschen werden können. Interessanterweise schreiben Alroy u.a. (2), daß in Paraffinschnitten gegenüber Gefrierschnitten die Lektinaffinität nicht nur abnehmen, sondern im Falle des Lektins RCA sogar zunehmen kann.

3. Lektinmarker:

Laut Watanabe u.a. (96) ist die FITC (Fluorescein-Isothiocyanat)-Methode der HRP-Markierung in der Sensibilität zum Teil überlegen. So wurden in ihren Versuchen Blutgefäße im Mäusegehirn erst durch FITC-DBA dargestellt.

4. Mäusestamm:

Vergleicht man verschiedene Lektinbindungsstudien, so sollte man beachten, daß das Glycoproteinmuster des Gewebes eines Mäusestammes erheblich von dem eines anderen Stammes abweichen und entsprechend unterschiedliche Lektinaffinitäten besitzen kann (57).

5. Lektinspezifität:

Jedes Lektin besitzt eine andere Zuckerspezifität, deshalb kann man nur Versuchsanordnungen mit demselben Lektin direkt

vergleichen. Auch wenn die angegebene Zuckerspezifität verschiedener Lektine übereinstimmt, können unterschiedliche Resultate auftreten (71, 72). Zurückzuführen ist dies auf die Spezifität der Lektine für die Tertiärstruktur der Kohlenhydratreste.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß die Aussagekraft der hier beschriebenen Versuche begrenzt ist auf die gewählte Methodik. Dabei zeigen die durchweg reproduzierbaren Ergebnisse, daß es möglich ist, mit labortechnischen Routinemethoden Lektinbindungsstellen und ihre Veränderungen im Verlauf der Zytodifferenzierung erfolgreich darzustellen.

5.2 Lokalisation und Funktion der DBA-Rezeptoren

Vergleicht man die Gewebsstrukturen, die mit DBA reagieren, so kann man sie in drei DBA-affine Gruppen unterteilen:

1. Zellmembranen der Endothelien von Blutgefäßen und Epithelien von Organen. Dazu gehören die Befunde an Gallengang, Bronchuli, Nebenhoden, Eileiter, Endokard und Ohr.
2. Intrazelluläre Materialien in Knochen, Zähnen, Sublingualdrüse, Magen, Duodenaldrüsen, Thymus, Neuronen der Riechschleimhaut, Nierentubuli, Oozyten und in den Glomeruli des Bulbus olfactorius.
3. Sezernierte Muzine in Submandibular-, Sublingualdrüse und im Nebenhoden.

Unter den Glycoproteinen unterscheidet man beim Säugetier als häufigste Formen die Serumproteine und die Muzine. Die Serumproteine bestehen aus Asparaginsäure mit N-glycosidisch gebundenem Glc-NAC. Dagegen besteht die Grundstruktur des Muzins aus O-glycosidisch an Serin oder Threonin gebundenem GalNAC. Beide Typen können auch als Membranglycoproteine und sogar innerhalb desselben Glycoproteins auftreten. Ihre Grundstruktur kann mit anderen Zuckern verlängert werden, z.B. mit NAC-Lactosamin am Serumprotein oder durch Sialinsäure am Muzin (56). Das sialysierte GalNAC-Muzin beschreiben Schulte u.a. (78) als Haupt-Oligosaccharid der ovinen Submandibulardrüse.

Welche Funktion der DBA-Rezeptor auf den Zellen der NMRI-Maus hat, läßt sich nicht eindeutig beantworten. Sein Auftreten und Verschwinden im Zuge der perinatalen Zytodifferenzierung läßt ihn als entwicklungsregulierenden Zelloberflächenmarker erscheinen, z.B. im Bereich der Zelladhäsion oder der Induktion von Differenzierungs- und Zellwanderungsvorgängen. Hierfür findet man in der Literatur etliche Hinweise:

De Felici (10) stellte an weiblichen Keimzellen von Mäusen fest, daß diese erst ab dem 1. Lebenstag eine langsam ansteigende DBA-Affinität besaßen und bis zum 3./4. Lebenstag vollständig DBA-positiv wurden. Diese Beobachtung führt er auf biochemische Veränderungen an der Plasmamembran der Oozyten während der postnatalen Differenzierung zurück. Dabei könnten die neugebildeten GalNAC-Kohlenhydratketten auf den Oozyten

als Mittler für Assoziationen zu somatischen Zellen während der Follikelformation dienen.

Plendl und Schmahl (57, 58, 59) beobachteten, daß Blutgefäße im Nervensystem während der Wanderungsphase der primitiven Neuronen DBA-Rezeptoren ausbildeten und später wieder verloren. Sie erklären dies damit, daß die DBA-positiven Blutgefäße als Leitschienen bei neuronalen Differenzierungs- und Wandervorgängen dienen könnten.

Noguchi u.a. (53) entdeckten eine Klasse von Glycoprotein-Kohlenhydratketten, die in Embryonen und embryonalen Karzinomzellen von Mäusen ausgebildet wurden. Diese Stoffe, die Noguchi "Embryoglycane" nennt, wurden in immer geringerer Zahl exprimiert, je mehr die Zellen differenzierten.

Wie die Expression der Lektin-Rezeptoren geregelt werden kann, beschreibt Oppenheimer (55). Ihre Zahl wie auch ihre Verteilung und Mobilität auf der Zelloberfläche können sich verändern und dadurch zu unterschiedlichen Informationen für benachbarte Zellen führen. In ähnlicher Weise beschreiben auch Roguet u.a. (65), daß die Lektinaffinität eine Konsequenz von Zahl und Zugänglichkeit der Rezeptoren sei.

Edelmann (15) führt aus, welche Mechanismen der embryonalen Musterbildung und Induktion von Differenzierungsvorgängen möglich sind. Zum einen können die Zellen bestimmte Marker besitzen, infolge derer sie sich nur mit Zellen anordnen, deren Marker die komplementäre Struktur besitzen. Diese Musterbildung als Folge von Chemoaffinität würde aber eine Vielzahl von Genen erfordern, um für die Proteinstruktur der verschiedenen Marker zu kodieren. Das zweite und von ihm

bevorzugte Modell ist das der dynamischen Musterbildung. Hierbei exprimieren die Zellen sogenannte Zelladhäsionsmoleküle (CAMs), deren Bindungsstärke sich dynamisch variieren läßt. In diesem Falle würden einige verschiedene CAMs und somit wenige Gene genügen, um Differenzierungsvorgänge zu regulieren.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich mit der These, daß der DBA-Rezeptor an der Regulation von Zelldifferenzierungsvorgängen beteiligt ist, zum Teil erklären. In verschiedenen Organen wie der Haut, dem Magen-Darm-Trakt, den Urogenitalorganen und im Zentralnervensystem nimmt die DBA-Affinität der Blutgefäße mit zunehmender Reifung der Organe ab. Thymuszellen und Oozyten werden bei alleiniger DBA-Behandlung immer weniger und schließlich nicht mehr DBA-positiv. Der Verlust der GalNAC-Reste könnte widerspiegeln, daß diese Struktur in der weiteren Entwicklung nicht mehr gebraucht wird oder gar störend wirkt. So beschreiben auch Raedler u.a. (62), Reisner u.a. (63) und Van der Valk und Hageman (90), daß PNA-Rezeptoren (Gal-GalNAC-Reste) an unreifen Thymus-Lymphozyten, nicht aber an deren reifen Formen vorhanden sind. Dabei schränken Van der Valk und Hageman jedoch ein, daß im embryonalen Thymus die Affinität für PNA bei reifen wie auch unreifen Lymphozyten gleich ist.

Eine sehr interessante Beobachtung, die mit den vorliegenden Befunden übereinstimmt, beschreiben Kasai u.a. (33). In allen von ihnen untersuchten Mäusestämmen besaßen die fetalen Thymuszellen DBA-Rezeptoren. Diese erschienen auf den Zellen, wenn die Stammzellen um den 13. Tag p.c. den Thymus erreicht

hatten und in Kontakt mit den Thymus-Epithelien traten. In der weiteren Ontogenese verloren die Zellen diese Rezeptoren rasch wieder, so daß neonatale Mäuse kaum mehr solche Strukturen auf den Thymozyten exprimierten. Die DBA-Rezeptoren waren nicht ausgebildet auf Zellen von adultem Lymphgewebe, aber auf verschiedenen Leukämiezelllinien der Maus. Ebenso wie die Expression der DBA-Rezeptoren, die identisch sind mit dem fetalen Thymus-Antigen FT-1, mit zunehmender Reifung abnahm, nahm die Expression des Thy-1-Antigens auf den Thymozyten zu. Das FT-1-Antigen könnte also eine Vorstufe von anderen T-Zell-Differenzierungs-Antigenen sein und als Marker zum Studium früher Stadien der T-Zell-Ontogenese benutzt werden. Weiterhin scheint mit dem FT-1-Antigen erstmalig ein onkofetales Antigen der T-Zell-Leukämie der Maus gefunden worden zu sein.

Neben dem bisher Beschriebenen gibt es auch Organe, in denen eine Lektinaffinität erst mit zunehmender Reifung entsteht und am adulten Tier maximal ausgebildet ist. Hierzu gehören Knochen, Zähne, Drüsenzellen von Sublingualdrüse, Magen und Dünndarm, Neuronen der Riechschleimhaut, Glomeruli des Bulbus olfactorius, Bronchuli-Epithelien und die Blutgefäße der Trachea und der Schilddrüse. Weiterhin findet man Gewebe mit gleichbleibender DBA-Affinität, wie die Blutgefäße des Pankreas. Für diese Befunde ist wahrscheinlicher, daß der GalNAc-Rest im Zuge der Zellreifung eine bestimmte Funktion auf der Zelle erwirbt, beispielsweise als Rezeptor für zirkulierende Substanzen oder als Histokompatibilitätsantigen.

Außerdem kann die DBA-Bindung ein Zeichen für anlaufende Stoffwechselprozesse sein, in denen Glycoproteine synthetisiert werden. Dies erklärt möglicherweise die DBA-Affinität der Drüsengewebe.

Farnum und Wilsman (19, 20) untersuchten an 4 bis 6 Wochen alten Yucatan-Schweinen die Bindung verschiedener Lektine an Knorpelregionen der Wachstumszone. Dabei stellten sie unterschiedliche Lektinaffinitäten in den verschiedenen Knorpelzonen fest. Sie nehmen an, daß durch die Veränderung der Glycoproteine im intra- und perizellulären Bereich Signale vermittelt werden, welche Vaskularisation und Verkalkung im Zuge der enchondralen Ossifikation verursachen. Die Autoren schreiben weiter, daß Makrophagen besonders gut an Galactose-, Fucose- und GalNAc-haltigen Resten haften. Die Ausbildung dieser Sequenzen könnte verantwortlich sein für den Mechanismus, über den die Blut-Makrophagen während der enchondralen Ossifikation aus dem Zirkulationssystem wandern und die unverknöcherte Knorpelmatrix phagozytieren.

Nakai u.a. (51) beschreiben Lektinbindungsstudien an sich entwickelnden Zähnen von Ratten. Mit zunehmender Differenzierung fanden sie eine steigende Lektinaffinität an Ameloblasten und Odontoblasten und führen dies auf die einsetzende Produktion von Zahnschmelz und Dentin zurück.

Schulte und Spicer (76) vergleichen die Ergebnisse der biochemischen Studien von Roukema u.a. (69) und Denny u.a. (13) über die murine Submandibulardrüse. Sie nehmen an, daß zwischen diesen Arbeiten auftretende Differenzen in der Beobachtung der Glycoproteinexpression darauf zurückzuführen

sind, daß ein Autor pubertäre, der andere Autor adulte Mäuse benutzte. Die fehlende Sialisierung von GalNAc-Resten bei den pubertären Tieren könnte auf einem entwicklungsabhängigen Mangel an Glycosyltransferase beruhen.

Betrachtet man die endgültige Verteilung der DBA-Bindungsstellen der NMRI-Maus, so fällt die besondere Affinität der Blutgefäße zu dem Lektin auf. Während Holthöfer u.a. (30) mit UEA I alle Blutgefäße des Menschen darstellen konnten, findet man die DBA-Affinität in der NMRI-Maus auf bestimmte Organe und innerhalb dieser Organe oft nur auf einen Teil der Blutgefäße beschränkt. Für dieses Verteilungsmuster gibt es verschiedene Erklärungen. Zum einen könnte der GalNAc-Rest ein Histokompatibilitätsantigen bzw. ein Teil eines solchen Antigens sein. Nach David (23) und Bach und Sachs (5) kodiert der H2-Lokus der Maus für deren "major histocompatibility complex" (MHC). Dieser Komplex von Zelloberflächenantigenen ist von großer Bedeutung für Abstoßungsreaktionen und ist im Gewebe unterschiedlich verteilt. Man findet ihn am häufigsten in lymphatischem Gewebe, in geringeren Anteilen in Haut, Lunge, Niere, Herz, Muskel und Erythrozyten, selten auf Spermien und nicht exprimiert in Nervengewebe, auf Oozyten und auf Trophoblastzellen. Inwiefern der GalNAc-Rest in Beziehung zu diesem H2-Lokus steht, ist nicht geklärt. Möglich wäre auch seine Beteiligung am "minor histocompatibility system", zu dem Antigene mit schwächeren Abstoßungsreaktionen gehören. Einen Teil des Histokompatibilitätssystems bilden die

Blutgruppen. Etzler und Kabat (17) beschreiben, daß im menschlichen Organismus die Blutgruppe A des ABO-Systems durch den DBA-Rezeptor exprimiert wird. Die Blutgruppenantigene A, B und H kommen nicht nur auf den Erythrozyten des Menschen, sondern auch auf Gewebszellen und in Sekreten wie Magensaft und Speichel vor (57). Hat man lange angenommen, daß die Blutgruppe A nur auf menschlichen Zellen ausgebildet wird, so weiß man heute, daß auch in Subprimaten, Hunden und Nagern eine Blutgruppe A-ähnliche Substanz vorhanden ist. Dies wurde aber nur in adulten Tieren nachgewiesen (57). Fujimoto u.a. (21) weisen darauf hin, daß die DBA-Rezeptoren in der Maus Ähnlichkeit mit bestimmten Antigenen wie dem Forssman-Antigen, einer Blutgruppe A-ähnlichen Substanz, haben.

Genkowski u.a. (26) und Auerbach u.a. (4) isolierten Blutgefäßendothelien und untersuchten deren Lektinaffinität. Unterschiedliche Ergebnisse an Blutgefäßen verschiedener Organe interpretieren sie mit dem Einfluß des Stammorgans auf die Glycoproteinstruktur des Endothels. Dabei erhalten während der Ontogenese die Blutgefäße gemeinsame Antigene mit dem Parenchym des Organs, aus dem sie stammen. Die Spezifität der Endothelien ist wichtig für selektive Zellerkennung, immunologische Reaktionen und die Antwort auf Wachstums- und Wanderungsfaktoren. Die Autoren führen an, daß antigen stimulierte Lymphozyten über die Freisetzung von Lymphokinen Angiogenese-Vorgänge induzieren können. Da organspezifische Antigene auf dem kapillären Endothel vorhanden sind, kann die Lymphokin-Freisetzung lokal erfolgen, wenn gegen diese Antigene sensibilisierte Lymphozyten in den Kapillaren

erneuten Antigen-Kontakt bekommen. Die Folge davon ist Neovaskularisation. Eine andere interessante Beobachtung Auerbachs u.a. (4) ist in diesem Zusammenhang, daß Tumorzellen in vitro eine bevorzugte Affinität für bestimmte Endothelien zeigen. Hepatomzellen binden sich bevorzugt an Leberendothelien, Gliomzellen an Gehirndendothelien und Teratomzellen an Endothelien des Ovars.

Auch De Grauw und Liwnicz (12) zeigen den Einfluß des umliegenden Gewebes auf die Expression von Glycoproteinen des Gefäßendothels. Sie beobachteten Veränderungen der Lektinaffinität von Gehirnkapillaren zu dem Zeitpunkt, an dem die Gliazellen in Kontakt mit den Kapillaren traten.

Ponder, Wilkinson und Uiterdijk (60, 86) untersuchten die Bindung von DBA an das Blutgefäßendothel verschiedener Mäusestämme, jedoch nicht der NMRI-Maus. Dabei fanden sie Organe, in denen sämtliche Blutgefäße DBA-positiv waren, aber auch solche, in denen nur bestimmte Endothelien eine DBA-Affinität zeigten. So fanden sie in Leber, Nebenniere, Milz und Lymphknoten das Kapillarendothel DBA-negativ, während die Arterien DBA-positiv reagierten. In Lunge und Niere verloren die Blutgefäße beim Übergang von mittleren zu kleinen Arterien ihre DBA-Affinität. Die Blutgefäße des Plexus chorioideus und der Meningen wurden, wenn sie in das Gehirn eintraten, nicht mehr angefärbt. Die Autoren finden für dieses Verhalten verschiedene Erklärungen. Auch sie diskutieren den Einfluß des umliegenden Gewebes auf das Blutgefäßendothel. Dafür spricht, daß Blutgefäße ihre DBA-Affinität oft verlieren, wenn sie in ein Organ eintreten oder es verlassen. Bovine Aorta-

Endothelzellen verändern ihre Glycoproteinstruktur in der Gewebekultur. Unklar ist, warum in manchen Organen nur die größeren Gefäße DBA-positiv sind. Hier ist evt. die Gefäßwanddicke verantwortlich, die das Endothel von Signalen des umliegenden Gewebes abschirmt. Denkbar ist auch, daß die Endothelien der Blutgefäße für das zugehörige Organ eine Art Gewebsadresse bilden. Dies bedeutet, daß aufgrund der spezifischen Glycoproteinverteilung auf dem Gefäßendothel zirkulierende, zelluläre und nicht zelluläre Substanzen aus der Blutbahn selektiv an den entsprechenden Rezeptoren haften und in das Parenchym aufgenommen werden.

Ein Beispiel für die Funktion der Blutgefäßendothelien ist das Phänomen des "homing" bei Lymphozyten. Lymphozyten rezirkulieren aus der Blutbahn in lymphoide Organe wie periphere Lymphknoten und Peyersche Platten des Darms, indem sie sich an bestimmte Venen mit kubischem Endothel binden und diese durchwandern. Dabei bevorzugen T-Lymphozyten die entsprechenden Venen der peripheren Lymphknoten, während B-Lymphozyten an denen der Peyerschen Platten anhaften. Es müssen also variierende Oberflächenmoleküle vorhanden sein, die diese Spezifität verursachen (31, 60, 66, 67).

Zum Transport durch die Gefäßwand sind Polaritätsunterschiede zwischen der apikalen und basolateralen Plasmalemm-Oberfläche nötig, die von Glycoproteinen gebildet werden. So findet man an der apikalen Membranoberfläche häufig saure Glycokonjugate (83). Daß die Verteilung und Ladung dieser Glycokonjugate von großer Bedeutung für den Stofftransport ist, zeigt sich auch am Gefäßendothel der Ratte. Nag (48) stellte fest, daß PNA-

Rezeptoren (Gal-GalNAc) auf allen Gefäßendothelien der Ratte vorhanden sind. Am cerebralen Gefäßendothel werden diese Zucker jedoch von Sialinsäure bedeckt, wodurch die Zelloberfläche eine andere, stärker negative Ladung erhält.

Glycoproteine nehmen herausragende Funktionen im Zellstoffwechsel des Organparenchyms wahr.

Schulte u.a. (78) stellten fest, daß bestimmte α -Gal-Glycokonjugate in den interlobulären Speicheldrüsengängen wie auch in den distalen Tubuli der Nieren von Ratten und Mäusen auftreten. Diese Gewebe sind beide am Transport von Flüssigkeit und Elektrolyten durch das Epithel beteiligt. Deshalb liegt es nahe, eine Beziehung zwischen Glycokonjugat-Struktur und zellulärer Funktion wie hydrophile und ionenbindende Eigenschaften zu knüpfen.

Daneben eignen sich Lektine auch, innerhalb eines bestimmten Funktionskomplexes Zellen mit unterschiedlichen Aufgaben zu differenzieren. Hennigar u.a. (28), Murata u.a. (47) und Hamada u.a. (27) stellten fest, daß im Bereich der distalen Tubuli der menschlichen und der Rattenniere sehr heterogene Lektinaffinitäten bestehen. In einem Tubulus können nebeneinander DBA-positive und DBA-negative Zellen liegen. Tatsächlich gibt es an den distalen Tubuli zwei Zelltypen. Die Hauptzellen besitzen eine saure Glycocalyx und sind verantwortlich für die K^+ -Sekretion und Na^+ -Rückresorption, während zwischengeschaltete Zellen mit neutraler Glycocalyx K^+ im Austausch gegen durch Carboanhydrase erzeugte Ionen rückresorbieren. Bei der Ratte ist die Verteilung von

zwischengeschalteten und DBA-affinen Zellen etwa vergleichbar, so daß DBA evt. als Marker für diese Zellen benutzt werden könnte.

Wurster u.a. (97) fanden am menschlichen Duodenum variierende Lektinaffinitäten, z.B. waren etwa 40 % der Becherzellen DBA-positiv, die Brunnerschen Drüsen waren unterschiedlich angefärbt. Diese Differenzen interpretieren die Autoren als Zeichen eines unterschiedlichen Reifungs- und funktionellen Status.

Den Einfluß von Glycoproteinen auf die Zellfunktion erwähnen auch Watanabe u.a. (96). Sie beobachteten in ihren Lektinbindungsstudien an Mäusen eine Affinität des Cytoplasmas der Oozyten für DBA. Da DBA die Fertilisation von Hamstereiern verhindern kann (54), schließen die Autoren darauf, daß der GalNAc-Rest eine Rolle bei der Fertilisation von Oozyten spielt.

5.3 Freilegung der DBA-Rezeptoren durch Enzymbehandlung

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, DBA-Bindungsstellen routinemäßig durch Neuraminidase-Behandlung und stichprobenweise durch Inkubation in α -, β -Galactosidase und α -Fucosidase freizulegen. Dabei konnte man stets durch die Inkubation in Enzym-Pufferlösung eine Affinitätssteigerung in der DBA-Reaktion finden. Zu beachten ist aber, daß auch bei der Inkubation in reiner Pufferlösung eine Freilegung von DBA-Rezeptoren erfolgte, die mit Ausnahme des Befundes an den

Bronchuli der Enzym-Puffer-Inkubation glich. Obwohl die Neuraminidase-Behandlung vor der Lektinfärbung häufig angewendet wird (1, 9, 29, 40, 45, 48, 50, 56, 91) und in der Literatur auch die Durchführung von Kontrollreaktionen mit enzymfreiem Puffer angegeben wird (18, 43, 61, 78), wurde ein Puffereffekt in diesen Versuchen niemals beschrieben.

Wie diese unterschiedlichen Ergebnisse zu interpretieren sind, ist auch nach Abschluß der hier vorgestellten Versuche nicht ganz klar. Möglicherweise wurden von den genannten Autoren nicht exakt dieselben Versuchsbedingungen bei der Kontrollreaktion eingehalten. So spielt die Temperatur, die während der Inkubation auf die Präparate einwirkt, eine große Rolle, denn infolge der erhöhten Molekularbewegung werden Dissoziationsvorgänge erleichtert.

Menghi u.a. (43) stellten anhand des Kaninchen-Eileiters den Einfluß von verschiedenen Glycosidasen auf die Lektinbindung dar. Sie verglichen die Resultate in enzymfreiem und enzymhaltigem Puffer und stellten vor allem nach Sialidase- und α -Fucosidase-Behandlung deutliche Differenzen fest. Bemerkenswert ist, daß sie keine Lektinbindungsstudien ohne jegliche Inkubation, wie sie den hier vorliegenden Versuchen entsprechen könnten, ausführten. Deshalb ist ihren Versuchen nur zu entnehmen, daß es einen tatsächlichen Enzymeffekt gibt, nicht aber, ob es auch einen realen "Puffereffekt" gibt.

Hingegen beschreibt Schauer (74), daß eine Entfernung von Glycoproteinen oder anderen anionischen Makromolekülen physikalisch durch Lösungsprozesse im Puffer stattfinden kann und durchaus kein ungewöhnlicher Effekt ist.

Welche Makromoleküle sich letztendlich im Puffer ablösen, bleibt ungeklärt. Der Umstand, daß Sialinsäure ein weit verbreiteter terminaler Zucker ist und aufgrund ihrer elektronegativen Ladung im Puffer besonders leicht abdissoziiert, spricht für die Beteiligung dieses Moleküls.

Der Befund an den Bronchuli wäre in diesem Zusammenhang nur dadurch zu erklären, daß die Sialinsäure hier sterisch anders angeordnet oder an ein anderes Molekül gebunden ist und sich deshalb nur durch Neuraminidase-Behandlung ablöst.

Mit der unterschiedlichen Position der Sialinsäure im Glycoprotein können auch die vorliegenden Befunde an Knochen und Ovar erklärt werden. Im Knochen wurden nach Neuraminidase-Behandlung die Knorpelzellen und das Osteoid DBA-negativ. Wie bereits erwähnt, findet die Bindung der Sialinsäure in der Regel in terminaler Position statt, kann aber auch, wenn auch seltener, als interne Sialinsäure zwischen zwei Zuckern auftreten (74). In diesem Fall würde ein Herauslösen der Sialinsäure bedeuten, daß auch der terminale Kohlenhydratrest vom Glycokonjugat abgelöst wird.

Das interessanteste Beispiel für diese vermuteten Stereoisomerien sind die Oozyten. Diese waren bis zum 3. Lebenstag der Mäuse DBA-positiv und nach Neuraminidase-Behandlung DBA-negativ. Nach dem 3. Lebenstag fand man jedoch genau umgekehrte Verhältnisse: Die Oozyten wurden erst nach Neuraminidase-Behandlung DBA-affin. Folgende Erklärung ist dafür denkbar: Bis zum 3. Lebenstag besitzt das Glycoprotein ein internes Sialinsäuremolekül; der GalNAC-Rest ist in terminaler Position. Eine Neuraminidase-Behandlung führt zur

Ablösung der Sialinsäure einschließlich des terminalen GalNAc-Restes. Nach dem 3. Lebenstag bindet sich im Zuge von Reifungsprozessen Sialinsäure terminal an das Molekül; GalNAc steht in subterminaler Position. Durch die Anheftung dieser zweiten Sialinsäure kann die Konfiguration des ganzen Moleküls so verändert werden, daß die interne Sialinsäure sich im Puffer nicht mehr ablöst. Die terminale Sialinsäure dissoziiert dagegen im Puffer ab und legt nun den vorher maskierten GalNAc-Rest frei.

Der Befund, daß im Laufe der Zytodifferenzierung häufig terminales GalNAc von Sialinsäure bedeckt wird, erhebt zwangsläufig die Frage nach deren Bedeutung. Dabei gibt es zwei grundsätzliche Überlegungen:

1. Das GalNAc-Ende verliert während der Differenzierung seine Bedeutung oder kann sogar eine weitere Entwicklung stören. Deshalb wird es - als Sofortmaßnahme - maskiert mit Sialinsäure. Im Weiteren kann dieses Konjugat an der Zelloberfläche bleiben, um evt. zu einem anderen Zeitpunkt wieder demaskiert und damit rasch einsatzfähig zu werden. Es kann aber auch allmählich unter dem Schutz der Sialinsäure abgebaut werden. Diese Überlegung knüpft insbesondere an dem Befund an, daß die Thymuszellen und die cerebralen Blutgefäße durch Neuraminidase-Behandlung länger und deutlicher DBA-positiv wurden, aber mit einer zeitlichen Verzögerung schließlich auch nach Neuraminidase-Behandlung ihre DBA-Affinität verloren. Bestehen blieb der maskierte DBA-Rezeptor

dagegen z.B. an den Blutgefäßendothelien der Muskulatur und der Haut.

Bei der Maskierung von Oberflächendeterminanten spielt die Wasserbindungsfähigkeit des maskierenden Moleküls eine große Rolle. Allgemein gilt, daß die Antigenität eines Stoffes umso niedriger ist, je höher seine Wasserbindungsfähigkeit ist. So können sich z.B. an jede Carboxylgruppe eines Sialoglycoproteins 4 bis 5 Wassermoleküle lagern. Die Hydratation hat verschiedene Folgen, die zusammen für die Maskierung verantwortlich sind. Es kann eine Konformationsänderung des Moleküls eintreten, wodurch die Struktur immunologisch nicht mehr erkannt wird. Antigene können sich über H-Brücken sowohl an Wasser als auch an Antikörper binden. Je größer die Affinität eines Antigens für Wasser ist, desto geringer ist sie für den entsprechenden Antikörper. Man nennt dies kompetitive H-Bindung. Wenn hydratisierte Saccharidketten einander überdecken und durchkreuzen, so geht ihre Hydratation oft mit Gelbildung einher. Dieses Gel kann von Makromolekülen bestimmter Größe nicht durchdrungen werden und schirmt auf diese Weise darunterliegende Strukturen ab (3).

2. Die Glycoproteine mit terminalem GalNac sind noch unvollständige Oberflächendeterminanten und erlangen durch das Anknüpfen von terminaler Sialinsäure ihre endgültige Reife oder eine völlig neue Funktion. Auch zu dieser Interpretation passen die Befunde an den Blutgefäßen von Muskulatur, Haut und Ganglien.

Welche Funktionen die Sialinsäure selbst während der

Differenzierung wahrnehmen kann, sei an einigen Beispielen beschrieben.

Die Blut-Hirnschranke wird von einem fortlaufenden, unfenestrierten Epithel mit "tight junctions" und vernachlässigbarer pinocytotischer Aktivität gebildet (14, 32). Auf der luminalen Oberfläche der Endothelzellen entsteht im Zuge der Reifung dieser Schranke eine elektronegative Ladung, die zu einem großen Teil durch Sialinsäuremoleküle verursacht wird. Neutralisiert man diese Ladung durch Kationen, so wird die Funktion der Blut-Hirnschranke eingeschränkt und ihre Durchlässigkeit z.B. für Meerrettichperoxidase erhöht (48, 92, 93).

Bei der Ratte gibt es auf den Kleinhirnneuronen das Oberflächenprotein D2, das eine wichtige Rolle in Zelladhäsion und Synapsenformation besitzt. Dieses Protein liegt in zwei möglichen Formen vor. Auf proliferierenden Neuronen, solchen während der Migrationsphase oder sich im Initialstadium der Differenzierung befindenden Neuronen ist Sialinsäure an das D2-Protein gebunden. Zur Zeit der Formation interneuroner Kontakte, bei der Ratte vom 1. bis zum 9. Lebenstag, steigt die Sialidase-Aktivität im Gehirn an. Als Folge davon wird die Sialinsäure vom D2-Protein abgespalten, das damit die reife, kathodische Form annimmt (41, 46). Dieser Übergang von einem sialysierten, unreifen zu einem desialysierten, reifen neuronalen Zelladhäsionsmolekül im Zuge der Differenzierung wird auch von Edelman (15) beschrieben. Hier ist also, entgegen dem bisher Beschriebenen, nicht die Ankoppelung, sondern der Verlust von Sialinsäure ein Zeichen von

Zellreifung. Die Sialinsäureabspaltung führt neben einer geringeren Oberflächenladung zu erhöhter Zelldeformierbarkeit, Zelladhäsion und Zellaggregation (79).

Hierzu ergänzend sei noch auf die Bedeutung von Sialinsäure für die Malignität von Tumorzellen hingewiesen. Tumorzellen mit hohem Malignitätsgrad unterscheiden sich von solchen mit geringem Malignitätsgrad durch eine stärkere Verzweigung und Sialisierung ihrer Fucose-haltigen Zelloberflächen-Kohlenhydrate (8). Eine zunehmende Sialisierung erhöht bei verschiedenen Tumorzelllinien deren Metastasierungspotential (8, 74). Dies ist auf verschiedene Weise zu erklären:

Um metastasieren zu können, dürfen die Tumorzellen im Blut- oder Lymphstrom immunologisch nicht erkannt werden. Neben den bereits beschriebenen Wegen, auf denen Sialinsäure antigene Strukturen maskieren kann (3), ist von Bedeutung, daß Thrombozyten bevorzugt auf stark sialisierten Zelloberflächen aggregieren und sie auf diese Weise von der immunologischen Abwehr abschirmen (74). Die Tumorzellen können also unerkannt in andere Organe abgeschwemmt werden. Die durch Sialisierung gebildete immunologische Schranke zu durchbrechen ist das Ziel von Therapieversuchen, in denen durch die Reinjektion Neuraminidase-behandelter Tumorzellen die Immunogenität eines Tumors erhöht werden soll (74, 79).

Sind die Tumorzellen im Metastasierungsorgan angelangt, so müssen sie aus den Gefäßen in das umliegende Gewebe invadieren. Um die Adhäsionskräfte des Gewebes beeinflussen zu können, benötigen sie wiederum einen erhöhten oberflächlichen Sialinsäuregehalt. Dies findet man auch physiologisch bei

reifen Granulozyten, die vorübergehend Leukämiezell-typische Kohlenhydrate ausbilden, wenn sie durch das Sinusepithel des Knochenmarks penetrieren (89). Die Bedeutung der Sialisierung von Tumorzellen bei Invasionsvorgängen wird in folgender Versuchsanordnung deutlich. Induziert man an nicht invasiven Tumorzellen experimentell eine Zelloberflächen-Sialisierung, so nehmen diese Zellen einen invasiven Charakter an. Umgekehrt sinkt aber die Invasivität von Tumorzellen in ein Gewebe, wenn dies einen experimentell erhöhten Sialinsäuregehalt aufweist (8). Inwieweit die Tendenz verschiedener Tumore, bevorzugt in bestimmte Organe zu metastasieren, vom Sialisierungsgrad dieser Organe abhängt, ist ungeklärt und sollte Gegenstand weiterführender Untersuchungen werden.

5.4 Geschlechtsdimorphismus an der Niere

Ein herausragendes Ergebnis dieser Arbeit ist der Befund, daß bei adulten Tieren im Bereich der Sammelrohre der Nieren ein deutlicher Geschlechtsdimorphismus besteht. Nur die Weibchen exprimieren nach Neuraminidase-Behandlung DBA-Rezeptoren. Trotz intensiver Literaturstudien (18, 24, 27, 28, 29, 35, 38, 47, 72, 75, 90, 96) konnte kein vergleichbarer, den Geschlechtsdimorphismus ebenfalls erwähnender Befund gefunden werden. Lektin-histochemische Studien an Nieren von Mäusen (29, 75, 96) kommen zwar zu dem Ergebnis, daß die Sammelrohre der Nieren DBA-affin sind. Holthöfer (29) macht jedoch keine näheren Angaben über Alter und Geschlecht der untersuchten

Tiere. Watanabe u.a. (96) benutzten männliche und weibliche Tiere im Alter von 4 bis 6 Wochen. In diesem Alter zeigten die von mir untersuchten NMRI-Mäuse nur eine unregelmäßige, nicht geschlechtsspezifische Affinität an den Sammelrohren. Schulte und Spicer (75) wiederum benutzten nur männliche Tiere.

Wie dieses Phänomen zu erklären ist und welche Bedeutung die unterschiedliche Glycoproteinstruktur auf den Sammelrohren hat, ist unklar.

Möglich ist, daß sich auf dem Y-Gen der Männchen ein Repressor befindet, der die Expression des Galactosyltransferase-Gens in diesen Zellen der Niere verhindert. Die Folge ist, daß GalNAc nicht an Glycoproteine gebunden werden kann. Vielleicht spielen auch die hormonellen Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tieren eine Rolle. Die Sammelrohre sind verantwortlich für Na^+ , Cl^- und H_2O -Rückresorption (82). Eine erhöhte Wassereinlagerung in das Gewebe unter hormonellem Einfluß könnte nicht nur durch Permeabilitätsveränderungen an den Blutgefäßen, sondern auch durch eine erhöhte Wasserrückresorption unter Einfluß des GalNAc-Glykokonjugats erfolgen. Hier sind weitere Untersuchungen erforderlich.

5.5 Spezifität der NMRI-Maus

Zahlreiche Arbeiten beschäftigen sich mit der Lektinaffinität von murinen Organen. Man findet sowohl Literatur über Affinitätsveränderungen während der Entwicklungsphase (7, 10, 52, 57, 58, 59, 62, 72, 90, 98) als auch über die Organe

adulter Tiere (1, 24, 29, 37, 42, 50, 60, 63, 64, 71, 75, 76, 77, 86, 96). Leider wird in solchen Versuchen nur selten die NMRI-Maus benutzt, sodaß die Vergleichsmöglichkeiten beschränkt sind.

Vergleicht man die vorliegenden Ergebnisse mit anderen Arbeiten, so findet man bei anderen Mäusestämmen sowohl Übereinstimmungen als auch Differenzen im Spektrum der DBA-Affinität von Organen und Geweben.

Bei allen untersuchten Mäusen ist der Gallengang DBA-positiv. Die Speicheldrüsen zeigen vergleichbare DBA-Affinitäten und auch das Cytoplasma der Oozyten färbt sich bei mehreren Stämmen deutlich an. Diese Ergebnisse stimmen mit der vorliegenden Arbeit weitgehend überein.

Dagegen finden einige Autoren DBA-Rezeptoren an Pankreasgängen, Retinazellen des Auges und bestimmten Hirnneuronen, was in meinen Versuchen nicht festgestellt werden konnte.

Interessanterweise berichten nur wenige Autoren über eine DBA-Affinität an Blutgefäßendothelien.

Watanabe u.a. (96) fanden im Mäusegehirn 6 bis 8 Wochen alter 129/slc^p- und Balb/c-Mäuse DBA-positive Hirnkapillaren.

Plendl (57) stellte an der NMRI-Maus während der Organogenese eine deutliche DBA-Affinität an den großen Blutgefäßen und dem Endothel der Gefäße des Zentralnervensystems fest. Die Mäusestämme CBA, C57Bl6 und Balb/c besaßen keine DBA-affinen Gefäße.

Ponder, Wilkinson und Uiterdijk (60, 86) prüften 35 Mäusestämme auf die DBA-Affinität des Gefäßendothels. Dabei

fanden sie nur 8 Stämme, deren Gefäßendothelien mit DBA reagierten (DDK, GRS/A, LTS.AF, MAS, SM/Ja, STS, SWR, RIII-ro). Die Autoren erklären das Phänomen der Stammspezifität damit, daß bei den Mäusestämmen verschiedene Allele eines Gens bestehen, das die gewebsspezifische Expression der Glycosyltransferase reguliert.

Mit der NMRI-Maus scheint also ein weiterer Mäusestamm gefunden worden zu sein, der die Glycosyltransferase am Blutgefäßendothel bilden kann.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit werden Zelldifferenzierungsvorgänge am Beispiel von Glycokonjugaten mit terminalem N-Acetyl-Galactosamin an der NMRI-Maus dargestellt.

Zur Untersuchung kamen Einzelschnitte von formalinfixierten und Paraffin-eingebetteten Mäusen der Perinatalperiode wie auch von einigen adulten Organen. Die Präparate wurden - zum Teil nach Vorbehandlung mit Neuraminidase - mit einem DBA-HRP-Konjugat inkubiert und die Bindungsstellen über eine Farbreaktion dargestellt.

Dabei kann man besonders an den Blutgefäßendothelien zahlreicher Organe eine auffällige DBA-Affinität erkennen. Weiterhin findet man verschiedene Organepithelien mit DBA deutlich dargestellt, insbesondere an den Bronchuli, dem Gallengang und den Nebenhoden. Auch intrazelluläre Strukturen können z.B. in den Neuronen der Riechschleimhaut und in den Oozyten mit DBA dargestellt werden. Häufig sind sezernierte Muzine DBA-affin.

Bei der Analyse der Verteilung von DBA-Rezeptoren während der Organreifung sind folgende Differenzierungsmuster zu erkennen: In verschiedenen Lokalisationen, z.B. in der Haut, dem Magen-Darm-Trakt, den Urogenitalorganen und im Zentralnervensystem, nehmen die Bindungsstellen für DBA mit zunehmender Reifung ab. In anderen Organen wie im Pankreas ist die DBA-Affinität gleichbleibend oder wird erst mit zunehmender Reifung des Organs ausgebildet. Letzteres findet man an den Zähnen, den Neuronen der Riechschleimhaut und an den Bronchuli-Epithelien

besonders deutlich ausgeprägt.

Die Vorbehandlung mit Neuraminidase führt an den meisten Organen zu einer Affinitätssteigerung für DBA, kann aber auch an verschiedenen Zellen eine Minderung der DBA-Bindungen verursachen, z.B. an Knorpelzellen und an Oozyten.

Die Affinitätsveränderungen für DBA werden aber auch durch eine alleinige Inkubation der Präparate in Pufferlösung verursacht. Ein tatsächlich objektivierbarer Enzymeffekt kann nur an den Bronchuli-Epithelien nachgewiesen werden.

Es wird diskutiert, welche Funktionen den DBA-Rezeptoren während der Organreifung und im adulten Organismus zukommen können und wie die Sialisierung dieser Strukturen zu interpretieren ist.

6. A B S T R A C T

Dolichos biflorus Lectin-Affinity and Degree of Sialylation as a Marker for Organ-differentiating Processes during Normal Development.

A Histochemical Study on the NMRI-Mouse

In the present study glycoconjugates with terminal N-acetyl-galactosamine have been demonstrated as an example for cell differentiating processes in the NMRI-mouse.

Formalin-fixed and paraffin-embedded sections of mice during the perinatal period and some adult organs were incubated with a DBA-HRP-conjugate. Some of the sections were pretreated with neuraminidase before being labeled. The affinity pattern was shown by a staining reaction.

Especially the endothelium of blood vessels of many organs is intensely labeled with DBA. Furthermore organ epithelia are strongly stained with DBA, in particular at the bronchuli, the bile duct and the epididymis. Even intracellular structures can be clearly demonstrated with DBA, for instance in the neurones of the olfactory epithelium and in oocytes. Also secreted mucins often have a distinct DBA-affinity.

Analysing the distribution of DBA-receptors during organ maturation following models of differentiation can be determined:

In different locations, for instance in the skin, the stomach, the gut, the urogenital organs and in the central nervous system, the DBA-affinity is decreasing with advancing

constant or is increasing with advancing maturation. The latter can be found in the teeth, the neurones of the olfactory epithelium and the epithelium of the bronchuli.

After pretreatment with neuraminidase the DBA-Affinity is raising in most of the organs, but it can also be diminished, for instance in chondrocytes and oocytes.

Differences in DBA-binding can also be caused by incubating the preparates in buffered solution. An actual enzyme effect can only be demonstrated at the bronchuli-epithelium.

The possible functions of the DBA-receptors during cell maturation and in the adult organism and the role of sialylation of these structures are discussed.

7. A B K Ü R Z U N G E N

p.c. = post conceptionem

Gal = Galactose

Man = Mannose

NAc = N-Acetyl-Rest

GalNAc = N-Acetyl-Galactosamin

GlcNAc = N-Acetyl-Glucosamin

HRP = horseradish (engl. Meerrettich) peroxidase

DBA

PNA

RCA = Abkürzungen für Lektine, siehe bitte

WGA Tabelle 1, Kapitel 2.1.1.4

UEA

8. Literaturverzeichnis :

- 1: Alroy J., Goyal V., Skutelsky E.: Lectin histochemistry of mammalian endothelium. *Histochemistry* 86 (1987) 603-607
- 2: Alroy J., Ucci A.A., Goyal V., Woods W.: Lectin histochemistry of glycolipid storage diseases on frozen and paraffin embedded tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.* 34 (1986) 501-505
- 3: Apffel C.A., Peters J.H.: Regulation of antigenic expression. *J. Theoret. Biol.* 26 (1970) 47-59
- 4: Auerbach R., Alby L., Morrissey L.W., Tu M., Joseph J.: Expression of organ-specific antigens on capillary endothelial cells. *Microvasc. Research* 29 (1985) 401-411
- 5: Bach F.H., Sachs D.H.: Medical Intelligence, current concepts, immunology, transplantation immunology. *The New England J. of Medicine* 317 (1987) 489-492
- 6: Bell C.M., Skerrow C.J.: Factors affecting the binding of lectins to normal human skin. *British J. of Dermatology* 2 (1984) 517-526
- 7: Blanks J.C., Johnson L.V.: Selective lectin binding of the developing mouse retina. *J. Comp. Neur.* 221 (1983) 31-41
- 8: Bolscher J.G.M., Schallier D.C.C., Smets L.A., Van Rooy H., Collard J.G., Bruyneel E.A., Mareel M.M.K.: Effects of cancer-related and drug-induced alterations in surface carbohydrates on the invasive capacity of mouse and rat cells. *Cancer Res.* 46 (1986) 4080-4086
- 9: Codegone M.L., Bussolati G., Spinnato M.R., Stramignoni A.: Selective binding of peanut lectin by T lineage

- lymphocytes in paraffin sections. *Bas. Appl. Histochem.* 27 (1983) 177-182
- 10: De Felici M.: Binding of fluorescent lectins to the surface of germ cells from fetal and early postnatal mouse gonads. *Gamete Res.* 10 (1984) 423-432
- 11: De Felici M., Boitani C., Cossu G.: Synthesis of glycoconjugates in mouse primordial germ cells. *Dev. Biol.* 109 (1985) 375-380
- 12: De Graw T.J., Liwnicz B.L.: Lectins are markers of neuronal migration and differentiation in rat brain. *Dev. Neurosci.* 8 (1986) 236-242
- 13: Denny P.A., Denny P.C., Jenkins K.: Purification and biochemical characterization of a mouse submandibular sialomucin. *Carbohydr. Res.* 87 (1980) 265-274
- 14: Dunn J.S., Wyburn G.M.: The anatomy of the blood brain barrier: a review. *Scottish Med. J.* 17 (1972) 21-36
- 15: Edelman G.M.: Zelladhäsionsmoleküle und embryonale Musterbildung. *Spektrum der Wissenschaft*, 6 (1984) 62-74
- 16: Etzler M.E.: Distribution and properties of the *Dolichos biflorus* lectins: a model system for exploring the role of lectins in plants. *Chemical Taxonomy, Molecular Biology and Function of Plant Lectins*. A.R. Liss, Inc., New York (1983) 197-207
- 17: Etzler M.E., Kabat E.A.: Purification and characterization of a lectin (plant hemagglutinin) with blood group A specificity from *Dolichos biflorus*. *Biochemistry* 9 (1970) 869-877

- 18: Faraggiana T., Malchiodi F., Prado A., Churg J.: Lectin-peroxidase conjugate reactivity in normal human kidney. *J. Histochem. Cytochem.* 30 (1982) 451-458
- 19: Farnum C.E., Wilsman N.J.: In situ localization of lectin-binding glycoconjugates in the matrix of growth-plate cartilage. *The American J. Anat.* 176 (1986) 65-82
- 20: Farnum C.E., Wilsman N.J.: Lectin-binding histochemistry of non-decalcified growth plate cartilage. *J. Histochem. Cytochem.* 32 (1984) 593-607
- 21: Fujimoto H., Muramatsu T., Urushihara H., Yanagisawa K.O.: Receptors to DBA. A new cell surface marker common to teratocarcinoma cells and preimplantation mouse embryos. *Diff.* 22 (1982) 59-61
- 22: Görög P., Pearson J.D.: Sialic acid moieties on surface glycoproteins protect endothelial cells from proteolytic damage. *J. Pathol.* 146 (1985) 205-212
- 23: Götze D.: The major histocompatibility system in man and animals. Springer Verlag Berlin New York (1977)
- 24: Goto H., Matsushima M., Maruyama T., Kihara T.: Distribution of ^3H -Con A and ^3H -WGA binding sites in mice by in vitro whole-body autoradiography. *Acta Histochem. Cytochem.* 18 (1985) 305-311
- 25: Green E.C.: Biology of the laboratory mouse. By the staff of the Jackson Laboratory. Dover Publications, Inc., New York (1975)
- 26: Gumkowski F., Kaminsko G., Kaminski M., Morrissey L.W., Auerbach R.: Heterogeneity of mouse vascular endothelium. *Blood Vessels* 24 (1987) 11-23

- 27: Hamada H.: Distribution of glycoconjugates in normal rat kidney determined by using horseradish peroxidase-labeled lectins. *Acta Histochem. Cytochem.* 16 (1983) 189-206
- 28: Hennigar R.A., Schulte B.A. Spicer S.S.: Heterogenous distribution of glycoconjugates in human kidney tubules. *The Anat. Record* 211 (1985) 376-390
- 29: Holthöfer H.: Lectin binding sites in kidney: a comparative study of 14 animal species. *J. Histochem. Cytochem.* 31 (1983) 531-537
- 30: Holthöfer H., Virtanen I., Kariniemi A.-L., Hormia M., Lindner E., Miettinen A.: Ulex europaeus I lectin as a marker for vascular endothelium in human tissue. *Lab. Invest.* 47 (1982) 60-66
- 31: Hooghe R.J., Pink J.R.L.: The role of carbohydrate in lymphoid cell traffic *Immunology Today* 6 (1985) 180-181
- 32: Joó: The blood-brain barrier in vitro: ten years of research on microvessels isolated from the brain. *Neurochem. Int.* 7 (1985) 1-25
- 33: Kasai M., Takashi T., Takahashi T., Tokunaga T.: A new differentiation antigen (FT-1) shared with fetal thymocytes and leukemic cells in the mouse. *J. Exp. Med.* 159 (1983) 971-980
- 34: Kocourek J., Horejsf: A note on the recent discussion on definition of the term "lectin". *Lectins - Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry* (ed. Bog-Hansen, Spengler) Vol. 3, Walter de Gruyter Berlin New York (1983)

- 35: Kunz A., Brown D., Orci L.: Appearance of *Helix pomatia*-lectin binding sites on podocyte plasma membrane during glomerular differentiation. A quantitative analysis using the lectin-gold technique. *Lab. Invest.* 51 (1984) 317-324
- 36: Leatham A., Atkins N.: Lectin binding to formalin-fixed paraffin sections. *J. Clin. Pathol.* 36 (1983) 747-750
- 37: Lee M.-C., Damjanov I.: Anatomic distribution of lectin-binding sites in mouse testis and epididymis. *Diff.* 27 (1984) 74-81
- 38: Le Hir M., Dubach U.C.: The cellular specificity of lectin binding in the kidney. I. A light microscopical study in the rat. *Histochem.* 74 (1982) 521-530
- 39: Lis H., Sharon N.: Lectins: their chemistry and application to immunology. *The Antigens* (ed. M. Sela) Vol. 4, Academic Press, New York (1977) 429-528
- 40: Luke J.L., Spicer S.S.: Histochemistry of surface epithelial and pleural mucins in mammalian lung. *Lab. Invest.* 14 (1966) 2101-2109
- 41: Meier E., Regan C.M., Balazs R.: Changes in the expression of a neuronal surface protein during development of cerebellar neurones in vivo and in culture. *J. Neurochem.* 43 (1984) 1328- 1335
- 42: Menghi G., Accili A., Bondi A.M., Materazzi G.: Glycosidic residues in the mouse submandibular gland: biochemical determination and visualization with plant lectins. *Bas. Appl. Histochem.* 30 (1986) 355-366
- 43: Menghi G., Bondi A.M., Accili D., Fumagalli L., Materazzi G.: Characterization in situ of the complex carbohydrates

- in rabbit oviduct using digestion with glycosidases followed by lectin binding. *J. Anat.* 140 (1985) 613-625
- 44: Michel M.: *Kompndium der Embryologie der Haustiere.* Gustav Fischer Verlag Stuttgart New York (1977)
- 45: Mills A., Haworth S.: Changes in lectin binding patterns in the developing pulmonary vasculature of the pig lung. *J. Pathol.* 149 (1986) 191-199
- 46: Moran N.M., Breen K.C., Regan C.M.: Characterization and cellular location of a developmentally regulated rat neural sialidase. *J. Neuroch.* 47 (1986) 18-22
- 47: Murata F., Tsuyama S., Suzuki S., Hamada H., Ozawa M., Muramatsu T.: Distribution of glycoconjugates in the kidney by use of labeled lectins. *J. Histochem. Cytochem.* 31 (1983) 139-144
- 48: Nag S.: Ultrastructural localization of lectin receptors on cerebral endothelium. *Acta Neuropath.* 66 (1985) 105-110
- 49: Nakagawa F., Schulte B.A., Wu I.-Y., Spicer S.S.: Postnatal appearance of glycoconjugate with terminal N-acetylgalactosamine on the surface of selected neurons in mouse brain. *Dev. Neurosci.* 9 (1987) 53-60
- 50: Nakagawa F., Schulte B.A., Spicer S.S.: Selective cytochemical demonstration of glycoconjugate-containing terminal N-acetylgalactosamine on some brain neurons. *The J. Comp. Neurol.* 243 (1986) 280-290
- 51: Nakai M., Tatemoto Y., Mori H., Mori M.: Lectin binding to the developing tooth. *Histochem.* 83 (1985) 455-463
- 52: Nemanik M.K., Whitehead J.S., Elias P.M.: Alterations in membrane sugars during epidermal differentiation. *J.*

- Histochem. J. 31 (1983) 887-897
- 53: Noguchi S., Ogata S., Muramatsu T.: Altered synthesis of glucosamine-labeled glycopeptides during postimplantation embryogenesis of the mouse. *Cell Diff.* 16 (1985) 223-228
 - 54: Oikawa T., Nicolson G.L., Yanagimachi R.: Inhibition of hamster fertilization by phytoagglutinins. *Exp. Cell Res.* 83 (1974) 239
 - 55: Oppenheimer S.B.: Interactions of lectins with embryonic cell surfaces. *Current Topics in Dev. Biol.* (ed. A.A. Moscona, A. Monroy) 11 (1977) 1-16
 - 56: Pena S.D.J., Gordon B.B., Karpati G., Carpenter S.: Lectin histochemistry of human skeletal muscle. *J. Histochem. Cytochem.* 29 (1981) 542-546
 - 57: Plendl J.: Die spezifische Darstellbarkeit von Blutgefäßen der NMRI-Maus während der Organogenese mit Dolichos biflorus-Agglutinin. *Diss. Univ. München* (1986)
 - 58: Plendl J., Schmahl W.: Histochemical characterization of CNS development in mice: a methodological contribution for evaluation of teratogenic effects. *Radiation Risks to the Developing Nervous System* (eds. Kriegel et al.) G. Fischer Verlag Stuttgart New York (1986) 671-74
 - 59: Plendl J., Schmahl W.: Binding of Dolichos biflorus agglutinin (DBA) to endothelial cells during the embryonal period is restricted to the NMRI-mouse. *Lectins, Biology, Clinical Biochemistry* (eds. Bog-Hansen, Van Driessche) Vol. 5, Walter de Gruyter Verlag Berlin (1985) 507-514
 - 60: Ponder B.A., Wilkinson M.M.: Organ-related differences in binding of Dolichos biflorus agglutinin to vascular

endothelium. Dev. Biol. 96 (1983) 535-541

- 61: Prime S.S., Rosser T.J., Mera S.L., Malamos D., Maitland N.J., Scully C.: Preferential lectin binding to specific layers of rat oral epithelium and modification by enzyme pretreatment. J. Invest. Dermatol. 85 (1985) 531-534
- 62: Raedler E., Raedler A., Feldhaus S.: Varying expressions of lectin receptors within embryonic cell layers of murine cerebral cortex. Anat. Embryol. 162 (1981) 21-28
- 63: Reisner Y., Linker-Israeli M., Sharon N.: Separation of mouse thymocytes into two subpopulations by the use of peanut agglutinin. Cell. Immunol. 25 (1976) 129-134
- 64: Rittman B.R., Mackenzie I.C., Rittman G.A.: Lectin binding to murine oral mucosa and skin. Archs oral Biol. 27 (1982) 1013-1019
- 65: Roguet R., Aubery M., Bourillon R.: Embryo cell surfaces - lectin binding and cell proliferation. Diff. 5 (1976) 107-113
- 66: Rosen S.D., Singer M.S., Yednock T.A.: Involvement of sialic acid on endothelial cells in organ-specific lymphocyte recirculation. Science 228 (1985) 1005-1007
- 67: Rosenberg A., Schengrund C.-L.: Biological roles of sialic acids. Plenum Press New York London (1976)
- 68: Roth J.: The lectins: molecular probes in cell biology and membrane research. Experimentelle Pathologie Suppl. 3, G. Fischer Verlag Jena (1978)
- 69: Roukema P.A., Oderkerk C.H., Salkinoja-Selonen M.S.: The murine sublingual and submandibular mucins: their

- isolation and characterization. *Biochim. Biophys. Acta* 428 (1976) 432-440
- 70: Rugh R.: The mouse - its reproduction and development. Burgess Publishing Company Minneapolis (1968)
- 71: Sato M., Muramatsu T.: Reactivity of five N-acetylgalactosamine-recognizing lectins with pre-implantation embryos, early postimplantation embryos and teratocarcinoma cells in the mouse. *Diff* 29 (1985) 29-38
- 72: Sato M., Yonezawa S., Uehara H., Arita Y., Sato E., Muramatsu T.: Differential distribution of receptors for two fucose-binding lectins in embryos and adult tissues of the mouse. *Diff.* 30 (1986) 211-219
- 73: Schauer R.: Sialic acids and their role as biological masks. *TIBS* 10 (1986) 357-360
- 74: Schauer R.: Sialic acids - chemistry, metabolism and function. *Cell Biology Monograph* Springer Verlag Wien New York, Vol 10 (1982)
- 75: Schulte B.A., Spicer S.S.: Histochemical evaluation of mouse and rat kidneys with lectin-horseradish peroxidase conjugates. *The Americ. J. Anat.* 168 (1983) 345-362
- 76: Schulte B.A., Spicer S.S.: Light microscopic detection of sugar residues in glycoconjugates of salivary glands and the pancreas with lectin-horseradish peroxidase conjugates. I. Mouse. *Histochem. J.* 15 (1983) 1217-1238
- 77: Schulte B.A., Spicer S.S.: Light microscopic histochemical detection of terminal galactose and N-acetylgalactosamine residues in rodent complex carbohydrates using a galactose oxidase-schiff sequence

- and peanut lectin-horseradish peroxidase conjugate. *J. Histochem. Cytochem.* 31 (1983) 19-24
- 78: Schulte B.A., Spicer S.S., Miller R.L.: Lectin histochemistry of secretory and cell-surface glycoconjugates in the ovine submandibular gland. *Cell Tissue Res.* 240 (1985) 57-66
- 79: Sedlacek H.H.: Contributions to oncology - tumor therapy with tumor cells and neuraminidase. Karger München, Vol 27 (1987)
- 80: Sharon N.: Lectins. *Scient. Americ.* 236 (1977) 108-117
- 81: Sharon N., Lis H.: Use of lectins for the study of membranes. *Methods in Membrane Biology* (ed. Korn), Plenum Press New York, Vol 3 (1974) 147-198
- 82: Silbernagel S., Despopoulos A.: *Taschenatlas der Physiologie*. Thieme Verlag Stuttgart New York (1979)
- 83: Spicer S.S., Baron D.A., Sato A., Schulte B.A.: Variability of cell surface glycoconjugates - relation to differences in cell function. *J. Histochem. Cytochem.* 29 (1981) 994-1002
- 84: Theiler K.: The house mouse. Development and normal stages from fertilization to 4 weeks of age. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York (1972)
- 85: Uhlenbruck: Lektine, Toxine und Immunotoxine. *Naturwissenschaften* 68 (1981) 606-612
- 86: Uiterdijk H.G., Ponder B.A.J.: The binding of Dolichos biflorus agglutinin to vascular endothelium and intestinal epithelium of mice, a genetic dimorphism. *Lectins - Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry* (eds. Bog-

- Hansen, Breborowicz), Walter de Gruyter Verlag Berlin New York, Vol 4 (1985) 161-168
- 87: Van Beek W.P., Smets L.A.: Carbohydrates of the tumor cell surface. *Biochim. Biophys. Acta* 738 (1984) 237-249
- 88: Van Beek W.P., Smets L.A., Emmelot P.: Tumor associated changes in the carbohydrate moiety of membrane glycoproteins. *Tumor Markers: Impact and Prospects* (eds. Boelsma, Rumke), Elsevier/North Holland Biomedical Press Amsterdam (1979) 61-78
- 89: Van Beek W.P., Tulp A., Bolscher J., Blanken G., Roozendaal K., Egbers M.: Transient versus permanent expression of cancer-related glycopeptides on normal versus leucemic myeloid cells coinciding with marrow egress. *Blood* 63 (1984) 170-176
- 90: Van der Valk M.A., Hageman P.: Distribution of lectin receptors in neonatal, embryonic and neoplastic mouse tissue. *Lectins - Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, Walter de Gruyter Verlag Berlin New York, Vol 2 (1982) 221-240
- 91: Vierbuchen M., Böhmer G., Uhlenbruck G., Fischer R.: Immuno- and histochemical studies on galactan and human blood group related receptors in the bovine lung. *Immunobiol.* 172 (1986) 11-20
- 92: Vorbrodt W., Dobrogowska D.H., Lossinsky A.S., Wisniewski H.M.: Ultrastructural localization of lectin receptors on the luminal and abluminal aspects of brain micro-blood vessels. *J. Histochem. Cytochem.* 34 (1986) 251-261

- 93: Vorbrodt A.W., Lossinsky A.S., Dobrogowska D.H., Wisniewski H.M.: Distribution of anionic sites and glycoconjugates on the endothelial surfaces of the developing blood-brain barrier. *Dev. Brain Res.* 29 (1986) 69-79
- 94: Warren L., Buck C.A.: The membrane glycoproteins of the malignant cell. *Clin. Biochem.* 13 (1980) 191-197
- 95: Warren L., Buck C.A., Tuszyński G.P.: Glycopeptide changes and malignant transformation: a possible role for carbohydrate in malignant behavior. *Biochim. Biophys. Acta* 516 (1978) 97-127
- 96: Watanabe M., Muramatsu T., Shirane H., Ugai K.: Discrete distribution of binding sites for Dolichos biflorus agglutinin (DBA) and for Peanut agglutinin (PNA) in mouse organ tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 29 (1981) 779-790
- 97: Wurster K., Peschke P.O., Kuhlmann W.D.: Cellular localization of lectin-affinity in tissue sections of normal human duodenum. *Virchows Arch. (Pathol. Anat.)* 402 (1983) 1-9
- 98: Zimmermann B., Thies M.: Alterations of lectin binding during chondrogenesis of mouse limb buds. *Histochem.* 81 (1984) 353-361

D A N K S A G U N G

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. W. Schmahl. Seine stete Ansprechbarkeit und seine wichtigen Anregungen haben mir bei der Durchführung dieser Arbeit entscheidend geholfen.

Weiterhin möchte ich mich herzlich bei Frau Dr. J. Plendl bedanken, auf deren Erfahrungen in der Lektin-Histochemie ich aufbauen konnte und die mir mit Rat und Freundschaft beiseite stand.

Mein Dank gilt auch Frau Huffstadt, Frau Senft, Frau Di Grazia, Frau Steege und Frau Treutler für die Einweisung in histologische Arbeitstechniken und ihre Hilfe bei auftretenden Problemen.

Meinem Freund Frank Munzlinger danke ich ganz besonders dafür, daß er mir mit Geduld beim Umgang mit seinem Computer geholfen hat.

L E B E N S L A U F

08.02.1962	geboren in Monzingen als Tochter von Wilhelm Schönleber und Frau Hannelore geb. Emrich
27.08.1968	Grundschule Monzingen
16.08.1972	Staatliches Gymnasium Sobernheim
25.05.1981	Abitur am Staatlichen Gymnasium Sobernheim
15.10.1981	Beginn des Studiums der Tiermedizin an der Justus Liebig-Universität Gießen
01.06.1986	Beginn der Promotionsarbeit bei der Gesellschaft für Strahlen- und Umwelt- forschung Neuherberg
02.07.1987	Tierärztliches Staatsexamen
30.07.1987	Approbation
07.1987 bis heute	Fortsetzung der Promotionsarbeit

